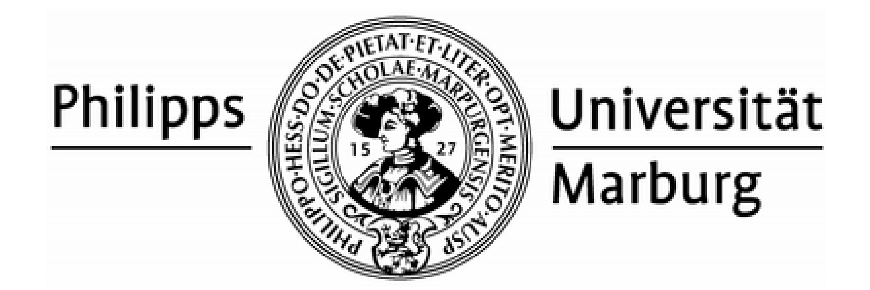
Aus dem Institut für Virologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

Mutationen im Hämagglutinin und dem NS1-Protein steigern die Virulenz hochpathogener aviärer Influenzaviren



Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Björn Keiner
aus München

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 22.04.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Tag der mündlichen Prüfung am: 25.04.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Material

3. Methoden

4. Ergebnisse

1. Einleitung

1.1 Taxonomie

Aviäre Influenza A-Viren werden der Familie der Orthomyxoviren zugeordnet. Hierbei handelt es sich um lipidumhüllte Viren mit segmentiertem, einzelsträngigem RNA-Genom in negativer Orientierung. Die Familie besteht aus den Genera der Influenza A-, B-, C-, der Thogoto- und Isaviren (siehe Tab. 1.1).
Nur Influenza A-, B- und C-Viren sind humanpathogene Erreger. Während Influenza B- und C-Viren neben dem Menschen nur Seehunde bzw. Schweine infizieren können (Baigent & McCauley, 2003), haben die Influenza A-Viren ein breiteres Wirtsspektrum, das viele Säugetier- und Vogelarten einschließt. Wildlebende Wasservögel stellen bei den Influenza A-Viren vermutlich das primäre Wirtsreservoir dar (Hinshaw et al., 1980; Rott et al., 1985).

Genus	Mensch	Tier
Influenza A-Virus	Influenza A-Viren	Influenza A-Viren (Schweine, Pferde, Robben, Puten, Enten, Möwen etc.)
Influenza B-Virus	Influenza B-Viren	Influenza B-Viren (Robben)
Influenza C-Virus	Influenza C-Viren	Influenza C-Viren (Schwein)
Thogotovirus		Thogotovirus, Dhorivirus (Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere, Zecken als Vektor)
Isavirus		(Infectious-Salmon-Anemia-Virus) (Lachse)

Tab **1.1** Unterteilung der Orthomyxoviridae und deren Wirte

Die Anzahl der RNA-Segmente unterscheidet sich in den verschiedenen Influenza-Genera: Acht für Influenza A und B und sieben für Influenza C. Influenza A- und Influenza B-Viren besitzen jeweils ein Glykoprotein mit Hämagglutinations- bzw. Neuraminidase-Aktivität, während Influenza C-Viren nur ein multifunktionelles Glykoprotein, das Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein, auf der Virusoberfläche besitzen (Herrler & Klenk, 1991). Die

Gliederung der Influenzaviren in die verschiedenen Genera A, B und C erfolgt aufgrund der serologischen Unterschiede in ihren Nukleokapsid (NP)- und Matrix (M)-Proteinen.
1980 vereinheitlichte die WHO die Nomenklatur für Influenzaviren. So werden der Reihenfolge nach der Typ, die Wirtsspezies (entfällt bei humanen Isolaten), der Ort der Isolierung, die Nummer des Isolats und das Jahr der Virus-Isolierung angegeben. Bei Influenza A-Viren wird zusätzlich in Klammern der Subtyp angefügt, beispielsweise Influenza A/ostrich/Italy/984/00 (H7N1) für ein aviäres Isolat aus dem Jahr 2000 in Italien. Die Unterteilung in die verschiedenen Subtypen basiert auf der Antigenität ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Derzeit sind 16 HA-Subtypen (H1, H2, etc.) und 9 NA-Subtypen (N1, N2 etc.) bekannt (Fouchier et al., 2005).

1.2 Morphologie

Influenzaviren sind sphärische oder filamentöse Partikel (Hoyle, 1968) mit einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Hülle der Influenzaviren stammt von der Zellmembran der Wirtszelle ab und stellt eine bei der Virusreifung von dieser übernommene Lipiddoppelschicht dar (Skehel & Wiley, 1995). Bei Influenza A- und B-Viren sind in die Virushülle die viruskodierten, transmembranen Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert, die 10-12 nm aus der Lipidhülle herausragen. Das HA liegt im Virion als Homotrimer vor und vermittelt Rezeptorbindung und Membranfusion. Die NA, deren aktive Form durch ein Homotetramer repräsentiert wird, besitzt rezeptorzerstörende Wirkung (Varghese et al., 1992). Influenza C-Viren besitzen statt der HA- und NA-Proteine mit dem Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF) nur ein einziges glykosyliertes Oberflächenprotein (Herrler et al., 1981). Bei Influenza A-Viren ist in geringen Mengen das M2-Protein als weiteres integrales Protein in die Hüllmembran eingelagert (Lamb et al., 1985), welches als Homotetramer vorliegt und die Funktion eines Protonenkanals hat (Sugrue & Hay, 1991; Pinto et al. 1992). Analog zu dem M2-Protein besitzen die Influenza B-Viren das NB-Protein und Influenza C-Viren das Protein CM2, die jedoch auf einem anderen Gensegment kodiert sind (Brassard et al., 1996; Tada et al., 1998). Im Inneren des Virions befinden sich bei Influenza A- und B-Viren acht, beim Influenza C-Virus sieben unterschiedlich große (Duesberg, 1969), einzelsträngige RNA (ssRNA)-Segmente in negativer Orientierung, die über die gesamte Länge mit den Nukleoproteinen (NP) komplexiert sind. Mit jedem RNA-Segment ist ein RNA-abhängiger RNA-

Polymerasekomplex assoziiert, der aus den Proteinen PB1, PB2 und PA besteht (Area et al., 2004, Muramoto et al., 2006). Der Komplex aus Polymerasekomplex, RNA und NP-Proteinen wird als Ribonukleoprotein (RNP) bezeichnet. Die RNPs interagieren mit den Matrixproteinen (M1), welche die Hüllmembran des Virus auskleiden und stabilisieren. Des Weiteren ist das nukleäre Exportprotein NEP/NS2 mit dem M1-Protein assoziiert, das im Viruspartikel in geringer Kopienzahl vorliegt (Richardson & Akkina, 1991; Yasuda et al., 1993). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) ist keine Komponente des Virions, sondern ist nur in der infizierten Zelle vorzufinden.

1.3 Genomaufbau und virale Proteine

Das Influenza A-Virus besitzt acht virale RNA-Segmente (vRNA), die in Negativstrangorientierung vorliegen und somit nicht *per se* infektiös sind. Die RNA kann nicht direkt als Boten-RNA (*messenger*-RNA, mRNA) zur Translation von viralen Proteinen verwendet werden (Neumann et al., 1999). Um die Transkription und Replikation zu gewährleisten, wird die kodierende Region jedes Segments von kurzen nicht-kodierenden Bereichen flankiert. Die nicht-kodierenden Regionen am 3'- und 5'-Ende der jeweiligen Segmente enthalten hoch konservierte Sequenzen von 12 und 13 Nukleotiden. Diese Sequenzen der einzelnen Segmente sind über kurze Bereiche zueinander komplementär und bilden Doppelstränge aus (Desselberger et al., 1980; Hsu et al., 1987; Flick und Hobom, 1999), die als Promotoren für die Initiation der Transkription und der Replikation dienen (Parvin et al., 1989).

Die meisten RNA-Segmente des Influenza-Genoms kodieren nur für ein bestimmtes Virusprotein. Die beiden kleinsten RNA-Segmente (das M- und das NS-Segment) des Influenza A-Virus kodieren jedoch für zwei Polypeptide, deren Translation von unterschiedlich gespleißten mRNA-Spezies ausgeht. Das Segment 7 kodiert für M1 und M2 (Lamb et al., 1981), das Segment 8 für NS1 und NS2 (Inglis und Almond., 1980). Das NS2-Protein wird auch als NEP (nuclear export protein) bezeichnet (O'Neill et al., 1998).

Eine gesonderte Position nimmt die PB1-mRNA ein. Sie wird zusätzlich im Leserahmen +1 translatiert, wodurch neben dem PB1-Protein das 87 Aminosäuren lange PB1-F2-Protein synthetisiert wird, welches eine Rolle im virusinduzierten Zelltod zu spielen scheint (Chen et al., 2001). Die Initiation findet dabei vermutlich durch ribosomales Scannen der PB1-mRNA statt.

Eine Auflistung der verschiedenen RNA-Segmente, deren kodierte Virusproteine und ihre Funktionen liegt in Tabelle 1.2 vor.

RNA-Segment	Länge (b)	Protein	Funktion
1	2341	**PB2**	Erkennung der Cap-Struktur der Wirtszell-RNA, Komponente des viralen Polymerasekomplexes
2	2341	**PB1**	Komponente des viralen Polymerasekomplexes, Endonuklease-Aktivität
		PB1-F2	Immunevasion
3	2233	**PA**	Komponente des viralen Polymerasekomplexes, genaue Funktion unbekannt
4	1778	**HA**	Typ-I-Membranprotein, Oberflächen-Glykoprotein, Homotrimer, Rezeptorbindung, proteolytische Aktivität, Fusionsaktivität, Antigendeterminante
5	1565	**NP**	Monomer, interagiert mit den viralen RNA-Segmenten (Ausbildung der Ribonukleoproteine, RNPs), Enkapsidierung von vRNA und antigenomischer RNA (cRNA), Kernimport der RNPs
6	1413	**NA**	Typ-II-Membranprotein, Oberflächen-Glykoprotein, Homotetramer, Abspaltung endständiger Neuraminsäuren, Antigendeterminante
7	1027	**M1**	Matrixprotein, aktiv bei der Morphogenese, am Kernexport der RNPs beteiligt
		M2	Typ-III-Membranprotein, Protonenkanal, fördert die Freisetzung der Nukleokapside aus dem Endosom
8	890	**NS1**	Nichtstrukturprotein im Cytoplasma und im Zellkern, inhibiert sowohl Spleißen als Auch Polyadenylierung und Kernexport der zellulären mRNA, Interferon-Antagonist
		NS2/NEP	Nichtstrukturprotein im Cytoplasma und im Zellkern, involviert im Kernexport der RNPs

Tab. **1.2** RNA-Segmente der Influenza A-Viren, kodierte Proteine und deren Funktion.

1.4 Replikationszyklus

Der Replikationsverlauf bei Influenzaviren beginnt mit dem Eindringen des Virus in eine permissive Wirtszelle. Im Zellkern findet die Transkription und Replikation des Genoms statt,

während die zelluläre Translationsmaschinerie im Zytoplasma die Synthese der viralen Proteine übernimmt. Nach Fertigstellung ausreichender Mengen neuer Virusbestandteile durch die Wirtszelle assembliert das Virus an der Zytoplasmamembran und wird durch Knospung freigesetzt.

Um in eine Wirtszelle eindringen zu können, ist eine Adsorption des Virus an zelluläre Rezeptoren notwendig. Das Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin (HA) des Influenza A-Virus bindet dazu an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren, die an Galaktosereste von glykosylierten Membranproteinen oder -lipiden gebunden sind. Das HA humaner Viren erkennt in den meisten Fällen eine α2,6-gebundene Neuraminsäure, während der überwiegende Teil der aviären Viren eine α2,3-glykosidische Bindung bevorzugen (Rogers und Paulson, 1983; Connor et al.; 1994). Über Rezeptor-vermittelte Endocytose gelangt das Virus ins Zellinnere. Die anschließende Ansäuerung der Endosomen durch zelluläre H^+-ATPasen bewirkt eine starke Konformationsänderung des HAs, die letztendlich in der Verschmelzung der endosomalen mit der viralen Membran endet (Übersicht s. Skehel und Wiley, 2000). Über den Protonenkanal des M2-Proteins wird der niedrige pH-Wert weiter ins Virusinnere gegeben, was zur Ablösung der Nukleokapside von den die Virusinnenseite auskleidenden M1-Proteinen führt (Helenius, 1992). Aufgrund der Kernlokalisationssequenzen der Nukleoproteine (NP) werden die RNPs über die zellulären Transportwege in den Zellkern gebracht (Whittaker et al., 1996; Wang et al., 1997).

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzt nicht die Fähigkeit, mRNAs mit 5´-Cap-Strukturen zu modifizieren oder diese zu methylieren und somit die Transkription der viralen Gene zu initiieren. Anstatt dessen haben die Viren den Mechanismus des „Cap-Snatching“ etabliert, bei dem die PB2-Untereinheit des Polymerasekomplexes das 5´-Ende einer zellulären mRNA an das 3´-Ende einer vRNA anlagert. Die PB1-Untereinheit schneidet dann die angelagerte mRNA durch ihre Nukleaseaktivität 10-13 Nukleotide vom 5´-Ende entfernt ab (Li et al., 2001). Dadurch wird sowohl eine 5´-Cap-Struktur als auch ein freies 3´-OH-Ende bereitgestellt, welches der viralen Polymerase als Primer für die Transkription dient (Ulmanen et al., 1981; Shi et al., 1995). Die mRNA wird nun von der PB1-Untereinheit bis zu einem Bereich von 15 bis 22 Nukleotide vor dem 5´-Ende der vRNA elongiert. Hier kommt es am Beginn des pfannenstielförmigen Doppelstrangbereichs in einer Uridin-reichen Region zum Stottern der Polymerase und somit zur Polyadenylierung der neusynthetisierten mRNA (Luo et al., 1991; Li und Palese, 1994). Die von den Gensegmenten 7 und 8 gebildeten Transkripte werden teilweise gespleißt. Zur Translation werden die mRNAs ins Zytoplasma exportiert. Die mRNAs der viralen Membranproteine werden durch Ribosomen direkt ins

rauhe endoplasmatische Retikulum synthetisiert und bleiben in der Membran verankert. Auf dem Weg über Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zytoplasmamembran werden sie glykosyliert und, im Fall von HA und M2, zudem noch palmitoyliert. NA und M2 bilden Tetramere während HA als Trimer in der Zytoplasmamembran vorliegt.

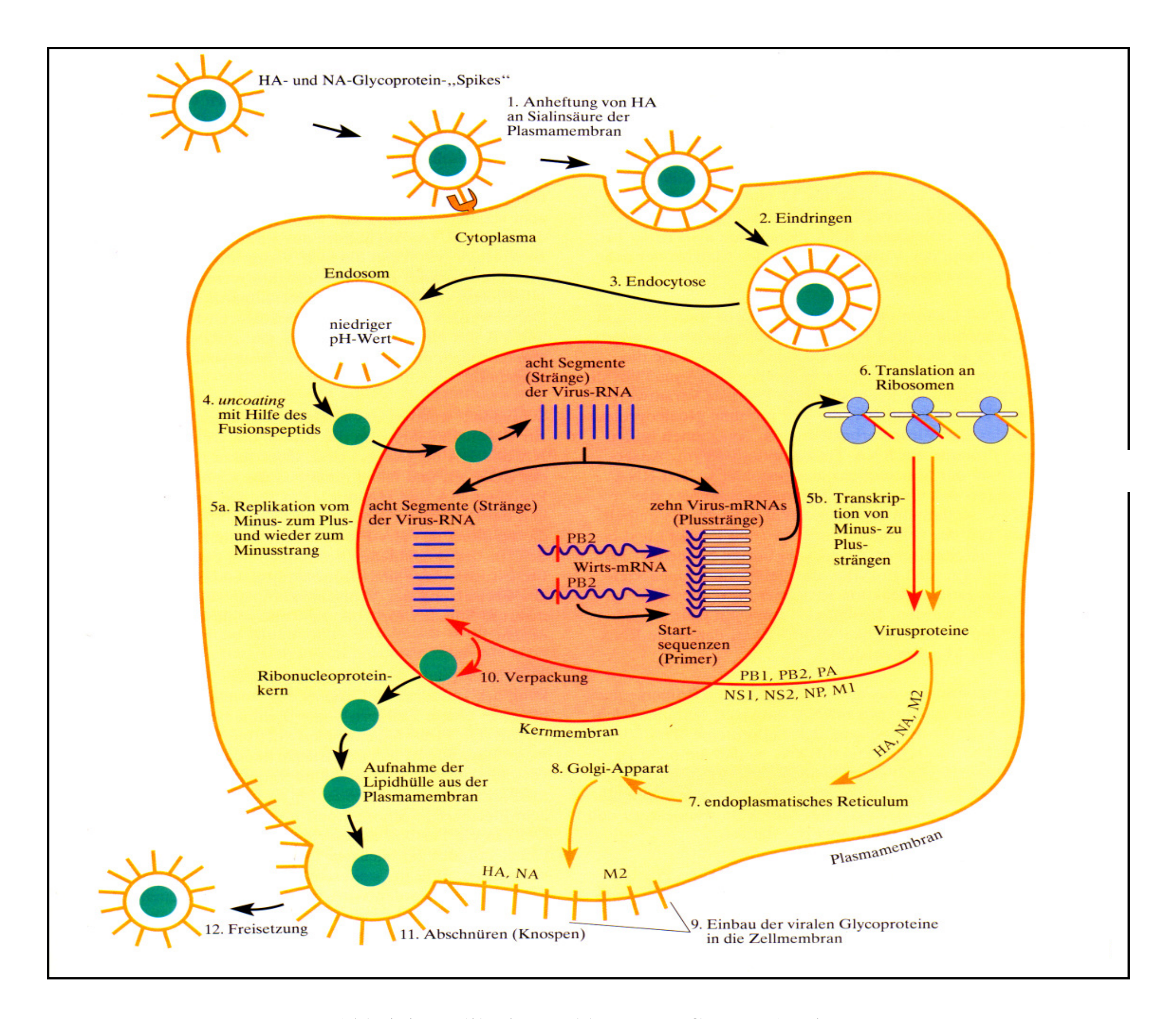


Abb **1.1** Replikationszyklus von Influenza A-Viren

Die übrigen Proteine werden an den Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert. Die Proteine PB1, PB2, PA, NP, M1, NS1 und NS2 besitzen Kernlokalisationssequenzen und werden daher zurück in den Zellkern transportiert. Sobald im Zellkern eine hohe Konzentration der Nukleoproteine vorliegt, werden die Pfannenstielstrukturen der vRNA aufgelöst und die Transkription kommt zum Erliegen. Nun setzt die Synthese von vollständigen Gegensträngen

(cRNA) ein (Beaton und Krug, 1986). Diese werden von Nukleoproteinen enkapsidiert und als Matrize zur Synthese neuer vRNAs verwendet. Die neusynthetisierten vRNAs assoziieren mit dem Polymerasekomplex und den NP-Proteinen zu RNPs, welche mit Hilfe des Matrixproteins M1 und des nukleären Exportproteins NS2 aus dem Zellkern in Richtung Zytoplasmamembran exportiert werden (Whittacker et al., 1996; O´Neill et al., 1998).

An Stellen erhöhter Konzentration viraler Membranproteine bilden sich initiale Budding-Strukturen, an denen es durch die Interaktion des Matrixproteins mit HA, NA und der Membran, als auch den RNPs zur Freisetzung neuer Viruspartikel kommt (Gomez-Puertas et al., 2000). Um das Verkleben der Viren untereinander und die Bindung an eine bereits infizierte Zelle zu verhindern, entfernt die Neuraminidase endständige Neuraminsäuren sowohl von der Hüllmembran der Virionen als auch von der Membran infizierter Zellen. Dadurch wird den neugebildeten Viren eine höhere Effizienz bei Freisetzung und Ausbreitung ermöglicht. Das Budding der Influenzaviren erfolgt an besonderen Cholesterin-reichen Lipidstrukturen auf der Zelloberfläche der Wirtszelle, den sogenannten Lipid Rafts (Scheiffele et al., 1999).

1.5 Influenza beim Menschen

Menschen werden immer wieder durch Influenzaviren infiziert, da die Viren in zweifacher Hinsicht genetisch instabil und somit in der Lage sind, einem auf sie wirkenden Selektionsdruck zu entgehen. Zum einen besitzt die RNA-abhängige RNA-Polymerase keine Korrekturlesefunktion (Proofreading), so dass es bei der Replikation zu der relativ hohen Fehlerrate von 10^{-5} Mutationen pro Nukleotid kommt. Durch den Erwerb von Punktmutationen in antigenen Bereichen der Oberflächenproteine können neue Subtypvarianten entstehen, die nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als *antigenic drift*. Zum anderen gibt es die Möglichkeit des Austausches ganzer Gensegmente zwischen verschiedenen Influenza-Subtypen. Solche Reassortanten können entstehen, wenn eine Zelle von zwei verschiedenen Influenzaviren infiziert wird und bei der folgenden Zusammenlagerung der Nachkommenviren ein Austausch von Segmenten stattfindet. Sind die Gensegmente der Oberflächenproteine vom Reassortment betroffen, kann es zum *antigenic shift*, der Entstehung neuer Subtypen mit stark abweichender Antigenität kommen (Scholtissek, 1979). Südostasien ist häufig der Ursprung solcher Reassortanten, da dort Menschen, Schweine und Vögel auf engstem Raum zusammenleben.

Schweine können sowohl von aviären als auch von humanen Influenzaviren infiziert werden und stellen somit eine Art von Mischgefäß für die Rekombination der viralen RNA-Segmente dar (Scholtissek et al., 1993). In jüngster Vergangenheit kam es jedoch ebenfalls zu schwerwiegenden Erkrankungen bei Menschen durch Influenza A-Viren aviären Ursprungs.

1.6 Epidemiologie der menschlichen Influenza

Die jährlich auftretenden Influenza A-Epidemien finden auf der nördlichen Hemisphäre von Oktober bis April und auf der südlichen Hemisphäre von Mai bis September statt. Die Krankheit überträgt sich durch Aerosole, so daß einer Ansteckung schlecht vorgebeugt werden kann.

In den Jahren 1918, 1957 und 1968 gab es drei große Influenza-Pandemien. Fast alle hatten ihren Ursprung in Südostasien und breiteten sich von dort nach Europa aus. In der Zeit zwischen den großen Pandemien kommt es zu kleineren Epidemien.

Eine Influenza-Pandemie zeichnet sich durch die beiden Eigenschaften der weltweiten Ausbreitung sowie hoher Mortalitätsraten aus (Webster & Laver, 1975). Treten neue Influenza A-Subtypen auf oder kommt es zur Wiederkehr eines alten Subtyps, hat der Großteil der Bevölkerung noch keine schützende Immunität gegen die neuen Oberflächenantigene der Viren entwickelt. Die neutralisierenden Antikörper gegen einen bekannten Subtyp kreuzreagieren nicht mit dem neu auftretenden Subtyp. Somit kann sich ein neuer Subtyp in der Bevölkerung ungehindert ausbreiten. Dem Ursprung einer Pandemie liegt eine Übertragung eines ursprünglich aviären Virus auf einen Säugetierwirt zu Grunde. Die Adaptation an den neuen Wirt kann entweder durch fortlaufende Mutationen oder durch Reassortierung zustande kommen (siehe 1.5).

Die Pandemie von 1918 war die schlimmste Pandemie in der Geschichte der Menschheit und forderte nach unterschiedlichen Angaben bis zu 50 Millionen Todesopfer (Johnson und Mueller, 2002). Aus archiviertem formalinfixiertem Lungenautopsiematerial und aus gefrorenem, nicht fixiertem Lungengewebe eines Influenzaopfers, das im November 1918 im Permafrostboden begraben wurde, ist das gesamte Genom des Pandemiestamms rekonstruiert worden (Taubenberger et al., 1997) und stellte sich als H1N1 Virus heraus, das offenbar ohne Reassortierung von Vögeln abstammte (Reid et al., 1999).

Die nachfolgenden Pandemiestämme gehörten zu den Subtypen H2N2 (1957/58) und H3N2 (1968): es handelte sich um reassortierte Viren, die Gene aviären Ursprungs enthielten. 1957

waren es drei Gene (HA, NA und PB1); 1968 waren es zwei (HA und PB1) (Kawaoka et al., 1989).
1997 wurde die erste Erkrankung mit einem H5N1-Stamm dokumentiert (Yuen et al., 1998). Neuere Isolate zeigen Mutationen in den Polymerasegenen, die sich der Genomsequenz des humanen 1918-Isolats angleichen (Taubenberger et al., 2005). H5N1 wird daher als ein Virus betrachtet, von dem möglicherweise eine weitere Pandemie ausgehen könnte. Bislang ist das H5N1-Virus jedoch ein Tierseuchenerreger, der nur in ganz seltenen Fällen durch intensiven direkten Kontakt mit erkranktem Geflügel auf den Menschen übertragen wird.

1.7 Klinik und Pathogenese

Die aerogen übertragenen Influenzaviren infizieren Menschen zuerst über die Epithelzellen im Nasopharynxbereich und breiten sich über die Trachea bis in die Bronchien und Bronchiolen aus.
Bei einer symptomatischen Infektion kommt es nach einer Inkubationszeit von normalerweise vier bis fünf Tagen zu ersten Krankheitserscheinungen wie Kopfschmerzen, Husten, Schnupfen, Kältegefühl und Schüttelfrost. Hohes, rasch ansteigendes Fieber bis 41°C, Muskelschmerzen, Appetitlosigkeit und allgemeines Krankheitsgefühl folgen. Ab dem dritten Tag geht das Fieber zurück. Bei älteren oder immunsupprimierten Patienten tritt als häufigste Komplikation eine primär virale, interstitielle Lungenentzündung auf, die innerhalb weniger Tage zum Tod führen kann. Ein häufig auftretendes Problem stellt eine durch bakterielle Superinfektion hervorgerufene sekundäre Lungenentzündung dar, die unter anderem durch *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* und *Hemophilus influenzae* verursacht werden kann (Tashiro et al., 1987). Ein Grund dafür ist die synergistische Fähigkeit einiger bakterieller Proteasen, bestimmte virale Hämagglutinine zu spalten.

1.8 Aviäre Influenza

Wildlebende Wasservögel sind die natürlichen Wirte und somit das Reservoir der Influenza A-Viren. Eine Influenzainfektion innerhalb dieser Spezies führt meist nicht zu einer symptomatischen Erkrankung. Die Virusreplikation in Vögeln findet meist im

Gastrointestinaltrakt statt. Die Ausscheidung der synthetisierten Viren verläuft über den fäkalen Weg.

1.9 Pathogenese der aviären Influenza

Aviäre Influenza A-Viren werden aufgrund ihrer Fähigkeit, schwere und nichtschwere Erkrankungen in domestiziertem Geflügel hervorrufen zu können, in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bilden die hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAI-Viren), die sich bisher auf die Subtypen H5 und H7 begrenzen. HPAI-Viren verursachen eine systemische Infektion mit hohem Fieber, Ödemen und Hämorrhagien, die in der Regel tödlich verläuft (Rott, 1992). Die Viren der zweiten Gruppe verursachen wesentlich milder verlaufende Erkrankungen. Die Infektion ist auf die Epithelien des Gastrointestinal- und Respirationstrakts beschränkt. Sie rufen milde Symptome hervor, die sich oft nur in verminderter Eiproduktion äußern (Capua und Alexander, 2002). Hierbei spricht man von niedrig pathogenen aviären Influenzaviren (LPAI-Viren).

1.10 Das Hämugglutinin als Pathogenitätsdeterminante

Jedes einzelne virale Protein trägt durch vielfältige Funktionen und Interaktionen zu einer effektiven Virusvermehrung bei. Die Frage, welche viralen Faktoren die Pathogenität, Virulenz und das Wirtsspektrum von Influenza A-Viren determinieren, ist daher noch nicht vollständig geklärt. Die Hauptpathogenitätsdeterminante scheint jedoch zumindest im aviären Wirt das Hämagglutinin (HA) zu sein.

Die Aktivierungsspaltung des HAs ist für die Infektiosität des Virions essentiell (Klenk et al., 1975). Während der Endozytose des Virus in eine neue Wirtszelle kann sich die fusogene Aktivität des HAs nur bei gespaltenem Protein entwickeln. Durch Umlagerung des HAs kommt es zur Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, die letztendlich zur Freisetzung der Nukleokapside in die Zelle und somit zur Virusreplikation führt. Bei einigen Virusstämmen des H5- und H7-Subtyps wird diese Reifespaltung des Hämagglutinins bereits im TGN durchgeführt. Dort prozessiert die Subtilin-ähnliche Protease Furin das Protein in die zwei Untereinheiten HA_1 und HA_2 (Stieneke-Gröber et al., 1992), die jedoch durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein

einer multibasischen Spaltstelle. Die minimale Furin-Erkennungssequenz ist R-X-K/R-R-G, wobei zwischen Arginin und Glycin gespalten wird (Vey et al., 1992). Da es sich bei Furin um eine ubiquitär vorhandene Protease handelt, können sich Viren mit multibasischer Spaltstelle systemisch im aviären Wirt ausbreiten. Bei den übrigen Virusstämmen, die nur eine mono- oder dibasische Erkennungssequenz besitzen, wird das HA auf der Zelloberfläche oder nach der Virusfreisetzung durch exogene Proteasen wie z.B. Tryptase Clara in der Lunge oder Trypsin-ähnliche Proteasen (Garten et al., 1981; Zhirnov et al., 2002) nachgespalten. Die Ausbreitung dieser Viren im Wirtsorganismus ist durch das Vorhandensein einer entsprechenden Protease beschränkt.
Der Gewebstropismus und die Wirtsspezifität werden darüber hinaus von der Rezeptorspezifität des Hämagglutinins geprägt. Aus der unterschiedlichen Verteilung der α2,3- und α2,6-gebundenen Sialinsäuren auf verschiedenen Zellen lassen sich zum Teil Rückschlüsse auf die Ausbreitung eines Virusisolats in einem bestimmten Wirt ziehen (Baum und Paulson, 1990; Ito et al., 1999).

1.11 Induktion und Wirkung von TypI-Interferonen

Doppelsträngige RNA (dsRNA) kommt in der Zelle unter normalen Umständen nur in sehr geringem Maß vor. Bei einer Infektion durch RNA-Viren kommt es jedoch durch die Aktivität der viralen Polymerase zu einem erhöhten Auftreten von dsRNA und 5`-Triphosphat-Einzelstrang-RNA (5´ppp-ss-RNA), was die Induktion von Typ-I-Interferon zur Folge hat und Zellen in einen antiviralen Status versetzen kann. Die Erkennung von dsRNA und 5´ppp-ss-RNA erfolgt über die Proteinkinase R (PKR), RIG-I (Retinoic Acid Inducible Gene I), MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5) oder Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) in der Membran von Vesikeln (siehe Abb. 1.2 A). Durch die Aktivierung dieser zellulären Proteine werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die über NF-κB (Nukleärer Faktor κB) und IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3) die Transkription von Interferon-α und -β stark erhöhen. Interferon wird daraufhin von der Zelle sezerniert und dockt an Interferonrezeptoren benachbarter Zellen an.
Die in Abbildung 1.2 B dargestellte Aktivierung von Interferonrezeptoren führt über die Phosphorylierung von STAT-1 (Signal Transducer And Activator of Transcription-1) und STAT-2 (Signal Transducer And Activator of Transcription-2) und der Rekrutierung von IRF-9 (Interferon Regulatory Factor 9) zur erhöhten Transkription und somit Expression von

Interferon-stimulierten Genen (ISGs). Zu diesen ISGs gehören unter anderem die 2´-5´-Oligoadenylate Synthetase (OAS) und die PKR. Die Stimulierung der OAS durch dsRNA im Zytoplasma führt zur Aktivierung der RNase L und somit zur Degradation sämtlicher RNA in der Zelle (Silverman, 2007). Eine Aktivierung der PKR durch dsRNA führt zudem zu einer Phosphorylierung des Translations-Elongationsfaktors 2 α (eIF-2α), was ein Abbrechen der Proteinsynthese zur Folge hat und somit als antivirale Reaktion der Zelle zu verstehen ist (Garcia-Sastre et al., 1998).

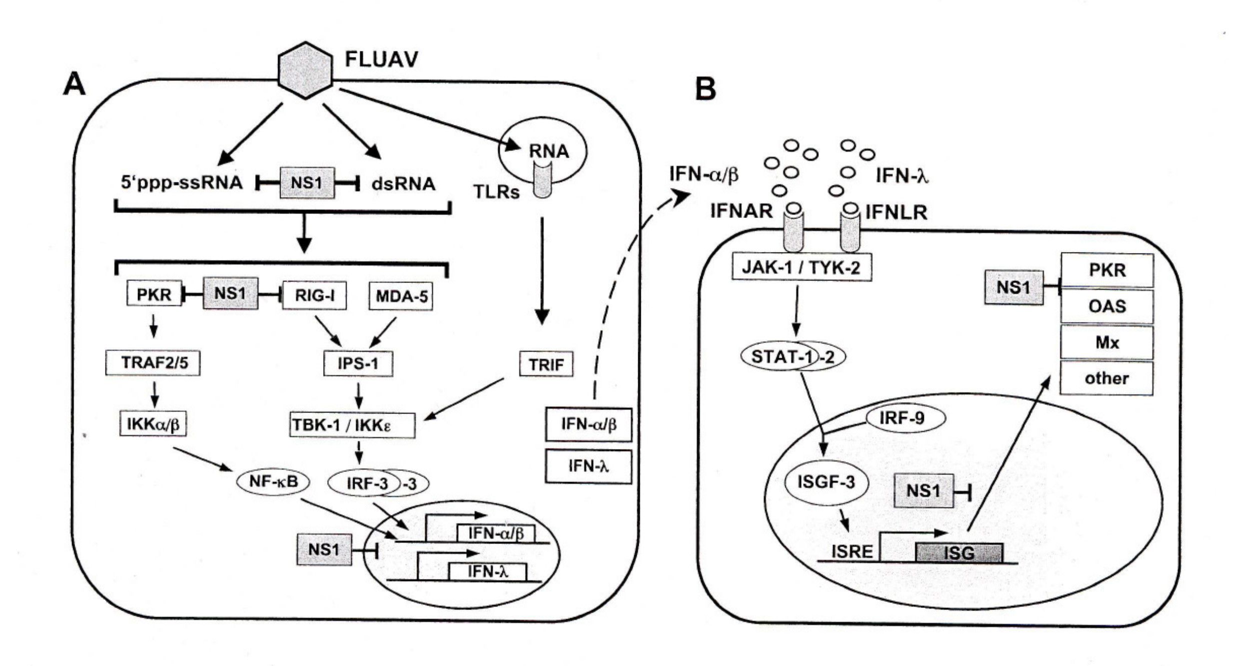


Abb.**1.2** Schematische Darstellung der Interferon-Induktion und der Inhibition durch NS1

1.12 Die Rolle des Nicht-Struktur-Proteins 1 (NS1)

Beim NS1 handelt sich um ein Nichtstrukturprotein, da es in infizierten Zellen synthetisiert, aber nicht in Virionen verpackt wird (Lamb und Krug, 2001). Es wird von dem kleinsten genomischen RNA-Segment mit 890 Nukleotiden kodiert und ist in der exprimierten Form je nach Virusspezies 202-237 Aminosäuren lang. Das NS1 ist ein multifunktionelles Protein, das sowohl an Protein-Protein, als auch an Protein-RNA Interaktionen beteiligt ist. Das 26 kDa große Protein wird dabei in zwei Domänen unterteilt (Qian et al., 1994; Wang und Krug, 1996), wobei die N-terminale Strukturdomäne (RNA-Binde-Domäne, RBD) das Virus primär vor der antiviralen Immunantwort durch Interferon-α/β schützt, während die C-terminale Strukturdomäne (Effektor Domäne) mit diversen zellulären Faktoren interagieren kann.

Die N-terminale RNA-Binde-Domäne beinhaltet die ersten 73 Aminosäuren des NS1-Proteins. Etwa in der Mitte der Domäne befindet sich das erste Kernlokalisationssignal (NLS1), dessen Aminosäuren 35, 38 und 41 entscheidend für die Bindung an Importin α sind. Mittels NMR und X-ray Kristallstruktur wurde gezeigt, dass NS1 symmetrische Homodimere bildet (Nemeroff et al., 1995; Bornholdt und Prasad, 2006). Diese binden an die antiparallelen Helices doppelsträngiger RNA (Wang et al., 1999). Eine Funktion dieser dsRNA-Bindung ist der Schutz gegen die antivirale Immunantwort durch Inhibition des in 1.11 beschriebenen Interferon-α/β induzierten 2´-5´-oligoadenylate synthetase (OAS) / RNase L Weges (Min et al., 2006). Zusätzlich verhindert NS1 durch Bindung an doppelsträngige RNA die Aktivierung der dsRNA-aktivierten Kinase PKR (Enami et al., 1994).

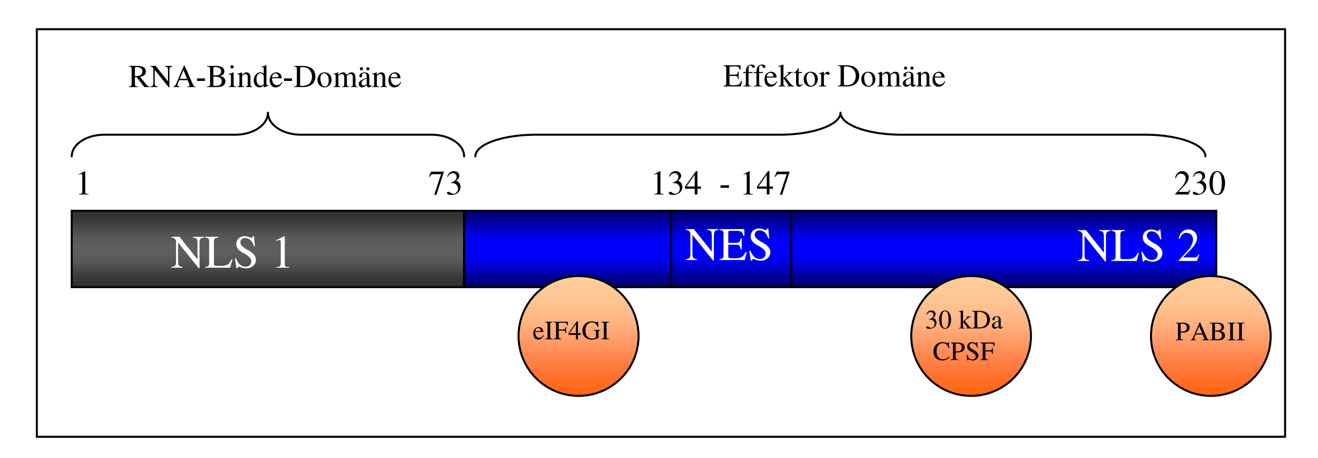


Abb **1.3** Schematische Darstellung des NS1-Proteins mit den bekannten Domänen und Interaktionspartnern

Des Weiteren wird die zelluläre U6 snRNA, eine Schlüsselkomponente des Spleißosoms, durch die RNA-Binde-Domäne blockiert. Dies führt zu einer Inhibition des Spleißens zellulärer mRNA (Wang et al., 1998). Durch die N-terminale und C-terminale Domäne werden neben Typ I Interferonen auch proinflammatorische Cytokine wie tumor necrosis factor-α, interleukin (IL) 6, chemokine (CC motif) ligand 3 (CCL3), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α), IL1β und IL18 inhibiert (Lin et al., 2007). Die C-terminale Domäne beinhaltet mehrere funktionelle Bindemotive für eIF4GI, CPSF (CPSF30) und PABII. Sie beinhaltet zudem ein NES (Kernexportsignal) und das NLS2. Durch die Interaktion von NS1 mit dem eukaryotischen Translationsinitiator eIF4GI erfolgt eine Verstärkung der Translation viraler Gene.

Mittels Bindung an PABII (Poly(A)-Binde-Protein 2) wird eIF4G an die 5´untranslatierten Regionen viraler mRNAs rekrutiert, wodurch eine Präferenz des Translationsapparates zu

Gunsten viraler mRNAs entsteht (Enami et al., 1994; Burgui et al., 2003). Die Menge an Interferon-β sinkt im Laufe der Influenza-Infektion. Dies ist durch die Bindung von NS1 an PABII und CPSF30 (Cleavage polyadenylation specificity factor 30 kDa) zu erklären, wodurch eine vollständige zelluläre mRNA Prozessierung der 3´Enden und der darauf folgende Export aus dem Zellkern verhindert wird (Noah et al., 2003). Zudem stellt dieser Effekt genügend RNAs mit Cap-Strukturen im Zellkern für die virale mRNA-Synthese bereit. Der Export viraler mRNAs wird durch das NS1-Protein nicht inhibiert, da die Poly(A)-Enden der viralen mRNAs durch den viralen Polymerasekomplex synthetisiert werden.

Apoptose ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der zellulären antiviralen Immunantwort. Eine Influenzainfektion kann hierbei in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist die antiapoptotische Phase, die NS1 durch Aktivierung des PI3K-Akt Weges herbeiführt und die eine effektive Virussynthese gewährleistet (Zhirnov und Klenk, 2007). Die zweite proapoptotische Phase findet größtenteils nach der Virusproduktion statt und wird induziert durch das zelluläre Protein p53 und das virale Protein PB1-F2 (siehe 1.13).

1.13 Weitere Pathogenitätsfaktoren

Die Neuraminidase ist neben dem HA und dem NS1 ein weiterer bedeutsamer Pathogenitätsfaktor. Beim Übergang eines aviären Influenza A-Virus von Wildvögeln auf domestiziertes Geflügel kommt es in den meisten Fällen zu einer Deletion des NA-Stielbereiches, wodurch die Enzymaktivität abnimmt. Für H5N1 Isolate aus Hühnern konnte gezeigt werden, dass dadurch ein Gleichgewicht zwischen Hämagglutinin-Bindung und Neuraminidase-Aktivität wiederhergestellt wird, das durch verringerte Rezeptor-Bindefähigkeit des HAs im neuen Wirt gestört war (Matrosovich et al., 1999). Zudem wurde gezeigt, dass die Neuraminidase des mausadaptierten, humanen H1N1-Isolats A/WSN/33 spezifisch zu einer Hämagglutinin-Aktivierung beiträgt. Die Neuraminidase dieses Virus kann den ubiquitär vorkommenden Plasmin-Vorläufer Plasminogen rekrutieren, welcher in der Lage ist HA zu spalten. So kann es trotz monobasischer HA-Spaltstelle zu einer systemischen Infektion kommen (Gao et al., 1999). Verantwortlich dafür sind ein C-terminales Lysin, sowie das Fehlen einer Zuckerseitenkette an Aminosäureposition 146 des NAs (Goto und Kawaoka 1998). Eine Mutation in einem dieser beiden Bereiche führt zu einer deutlich verringerten Virulenz des WSN-Isolats (Goto et al., 2001). Interne Virusproteine wirken sich ebenfalls auf Pathogenität und Wirtsspektrum aus. Ein Austausch des PB1-Gens eines humanen Isolates

mit dem eines aviären Virus führte zu einer Attenuierung der Replikation in MDCK Zellen jedoch nicht in Hühnernieren-Zellen (Snyder et al., 1987). Zudem wurde gezeigt, dass die viralen Proteine NP (Scholtissek et al., 1985), PB2 (Shinya et al., 2007; Subbarao et al., 1993; Hatta et al., 2001), M1 (Anwar et al., 2006), M2 (Feng et al., 2006) und NS2 (Iwatsuki-Horimoto et al., 2004) oftmals Mutationen zeigen, die ein Virus an bestimmte Wirte anpassen. Dies wurde besonders für alle Polymerasegene bei H7N7 (Gabriel et al., 2005) und H5N1 (Salomon et al., 2006) gezeigt. PB1-F2 induziert zellspezifisch Apoptose. So werden vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems gezielt abgetötet (Chen et al., 2001). Dies könnte ein weiterer viraler Schutz vor der Immunantwort des Wirtes sein und somit die Pathogenität beeinflussen. PB1-F2 wird allerdings als einziges virales Protein nicht von allen Influenzaisolaten exprimiert. Bei Virusisolaten aus bestimmten Tierarten, insbesondere Schweinen, ist der Leserahmen unterbrochen, so dass eine Expression des Proteins nicht stattfindet (Zell et al., 2007).

1.14 Ausbruch aviärer Influenzaviren 1999/2000 in Italien

Im Frühjahr 1999 kam es im Norden Italiens zur Übertragung eines aviären Influenza A-Virus des Subtyps H7N1 wahrscheinlich von wildlebenden Wasservögeln auf domestiziertes Geflügel. Die zu diesem Zeitpunkt in Hühnern noch niedrigpathogenen Viren breiteten sich auf insgesamt 199 Geflügelzuchtbettriebe in den Regionen Venetien und Lombardei aus und zeigten trotz monobasischer Spaltstelle des Hämagglutinins in jungen Puten bereits Mortalitätsraten von bis zu 97% (Capua et al., 2000). Im Dezember 1999 trat zum ersten Mal eine auch für Hühner hochpathogene Virus-Variante mit multibasischer Spaltstelle im HA auf. Da diese aufgrund der zuvor beobachteten erhöhten Mortalitätsraten in Puten nicht als hochpathogenes Virus erkannt wurde und Massen-Keulungen und weitere Schutzmaßnahmen ausblieben, kam es innerhalb kürzester Zeit zu weiteren 412 Ausbrüchen dieser HPAI-Viren (Capua et al., 2002).

Während von den LPAI-Viren zu Beginn fast ausschließlich Puten und Hühner betroffen waren, waren die HPAI-Viren in der Lage, viele weitere aviäre Spezies wie Pfaue, Strauße, Enten und Gänse zu infizieren (Capua et al., 2000; Capua und Mutinelli, Case report, 2001).

Die HA und NA-Gene der Virusisolate wurden größtenteils sequenziert und phylogenetisch analysiert (Banks et al., 2001). Die Neuraminidase aller sequenzierten Isolate weist eine Deletion von 22 Aminosäuren gegenüber dem nächstverwandten Wildvogelisolat

A/teal/Taiwan/WB-2-32-2TPFE2/98 auf. Eine solche Deletion konnte bereits häufiger bei der Einführung eines Wildvogelisolats in domestiziertes Geflügel beobachtet werden (Zhou et al., 1999; Spackman et al., 2003) und gilt als Ausweichreaktion des Virus auf den Selektionsdruck, dem es in dem neuen Wirt ausgesetzt ist. Die Spaltstelle des HAs der niedrigpathogenen Isolate weist größtenteils das weit verbreitete Motiv PEIPKGRGLF auf. Bei den hochpathogenen Viren wurde, bis auf vier geringfügig abweichende Isolate, die multibasische Sequenz PEIPKGSRVRRGLF nachgewiesen. Des Weiteren konnten für die späten Virusisolate zusätzliche Glykosylierungsstellen an Aminosäureposition 123 oder 149 im Rezeptorbindungsbereich des HAs festgestellt werden. Auffallend hierbei ist, dass alle hochpathogenen Viren mit multibasischer Spaltstelle ebenfalls ein Glykan an Position 123 des HAs besitzen.

1.15 Problemstellung

Im Verlauf der Influenza-Epizootie in Italien kam es im Dezember 1999 zum ersten Auftreten hochpathogener aviärer Influenzaviren (HPAI-Viren) welche aus zuvor grassierenden Viren niedriger Pathogenität (LPAI-Viren) hervorgingen (Banks et al., 2000). Innerhalb weniger Monate kam es zu weiteren 412 Ausbrüchen mit Mortalitätsraten von bis zu 100%. Durch Sequenzanalysen konnten Mutationen in den meisten viralen Proteinen der beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die auffälligste Veränderung zwischen HPAI- und LPAI-Viren war die Einführung einer multibasischen Spaltstelle im Hämagglutinin, welche als Grundvoraussetzung für eine erhöhte Pathogenität im aviären Wirt gilt. Weitere Auffälligkeiten waren die Entstehung einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinins (HA), sowie Mutationen in den zellulären Lokalisationssignalen des Nicht-Struktur-Proteins 1 (NS1), die ausschließlich in den hochpathogenen Varianten zu finden waren.

Um die Mutationen in den viralen Proteinen näher zu charakterisieren, sollten rekombinante HPAI-Viren des Isolats A/ostrich/Italy/984/00 hergestellt werden, die jeweils nur ein Protein des LPAI-Virus A/chicken/Italy/1082/99 tragen. Zusätzlich sollten HPAI-Virusmutanten hergestellt werden, deren Glykosylierungsmuster an der Rezeptorbindetasche des HAs dem der LPAI-Viren entspricht. In einem weiteren Teil der Doktorarbeit sollten HPAI-Varianten hergestellt werden, deren NS1-Gene die entsprechenden LPAI-Mutationen tragen. Die hergestellten Virusmutanten sollten bezüglich ihrer Replikationseffizienz in aviären Zellen

und anschließend auf Unterschiede in Pathogenität und Infektiosität untersucht werden. Ebenfalls sollten die funktionellen Auswirkungen der eingeführten Mutationen aufgedeckt werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid, Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose Seakem® LE	Cambrex Bio Science, Rockland
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin (Natrium-Salz)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	BD, Frankreich
Bovines Serumalbumin (BSA, 35%)	MP Biomedicals, USA
Bovines Serumalbumin (BSA, 98%)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-Oktan)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DEAE-Dextran	Sigma, Deisenhofen
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Denhardt´s-Lösung (50x)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard Massruler ™	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT	Boehringer, Mannheim
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruh
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Fisch-DNA aus Heringsspermien	Roche, Mannheim
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Hefe-tRNA	Roche, Mannheim
Isopentan	Riedel-de Haen, Seelze
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
Jodlösung	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamin ™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Mowiol 4-88	Calbiochem, USA
Natriumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphatdodecahydrat	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Page Ruler Prest. Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penecillin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton	Merck, Darmstadt
Phenolrot	Riedel-de-Haen, Seelze
Polyethylenglykol (4000)	Sigma, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Sachharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
TEMED (N,N,N',N''-Tetramethylendiamin)	BioRad, München
Triethanolamin (TEA)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tris (Trishydroxymetylaminomethan)	Acros organics, USA
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Xylol	Sigma, Deisenhofen

2.2 Antikörper

Anti-Influenza A NS1: sc-17596 (goat)	SANTA CRUZ, Santa Cruz
Anti-β-Aktin (mouse)	Abcam, Cambridge, U.K.
Anti-Ziege Rhodamin (Esel)	Jackson, Suffolk, U.K.
Anti-Ziege 800 (Esel)	Rockland, U.S.A.
Anti-Maus 800 (Ziege)	Rockland, U.S.A.
Anti-Kaninchen HRP (Schwein)	Dako, Dänemark
Anti Kaninchen 800 (Ziege)	Rockland, U.S.A.
Anti-KP-Serum (Kaninchen)	Inst. F. Virologie, Marburg

2.3 Enzyme

DNase I	Stratagene, Heidelberg
Pfu-Turbo®-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
PfuUltra™ DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinkinase K	Qiagen, Hilden
RNase A	Roche, Mannheim
RNase T1	Roche, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
TPCK-Trypsin	Sigma, Deisenhofen
10x Trypsin, 2,5%	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

Restriktionsendonukleasen

BsmBI	CGTCTC(1/5)↓	NEB, Frankfurt

BstUI	CG↓CG	Fermentas, St. Leon-Rot
DpnI	GmA↓TC	NEB, Frankfurt
Eco 31I	GGTCTC(1/5)↓	Fermentas, St. Leon-Rot
Hind III	A↓AGCTT	Fermentas, ST. Leon-Rot
NarI	GG↓CGCC	Fermentas, St. Leon-Ro
MseI	T↓TAA	NEB, Frankfurt.

2.4 Plasmide

pBluescript KS+	Stratagene, Heidelberg
pUc 18	Stratagene, Heidelberg
pHH21	Labor von Y. Kawaoka, Madison, USA
polISapI	Jürgen Stech
pHW2000	Erich Hoffmann

2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Klonierungsprimer

BDUni-PB1#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGCA-3'
BDUni-PB1#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGCA-3'
BDUni-PA#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTAC-3'
BDUni-PA#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTAC-3'
BDUni-PB2#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTC-3'
BDUni-PB2#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTCG-3'
BDUni-HA#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGG-3'
BDUni-NP#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTA-3'
BDUni-NP#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTA-3'
BDUni-N1#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGAGT-3'
BDUni-N1#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGAGT-3'
BDUNI-M#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAAGCAAAAGCAGGTAG-3'
BDUni-M#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTAG-3'
BDUni-NS#1	5'-CGAAGTTGGGGGGGAAGCAAAAGCAGGGTG-3'
BDUni-NS#2	5'-GGCCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG-3'

Mutageneseprimer

HA-GS1-NarI-Fo	5´-GGAATAAGAACTAATGGCGCCACCAGTA CATGTAGG-3´
HA-GS1-NarI-Re	5´-CCTACATGTACTGGTGGCGCCATTAGTTC TTATTCC-3´
HA-GS2-BstUI-Fo	5´-CTGTCAAACACAGACAACGCGACATTCC CGCAGATGACTAAG-3´
HA-GS2-BstUI-Re	5´-CTTAGTCATCTGCGGGAATGTCGCGTTGT CTGTGTTTGA CAG-3´

Ital-NS-VD/IN-fo	5'-GCTAATTTCTCAATCCTATTTAATCAACTAGAAAC-3'
Ital-NS-VD/IN-re	5'-GTTTCTAGTTGATTAAATAGGATTGAGAAATTAGC-3'
Ital-NS-IN/VD-fo	5'-GCTAATTTCTCAGTCCTATTTGATCAACTAGAAAC-3'
Ital-NS-IN/VD-re	5'-GTTTCTAGTTGATCAAATAGGACTGAGAAATTAGC-3'

2.6 Kits

High-Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep8® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quik-Change Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Nuclear Extraction Kit	IMGENEX, San Diego

2.7 Zellkultur

Materialien

6 Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
12 Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96 Well-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (75 cm2)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Ø: 6 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Medien

MEM (2x)	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM® I	Gibco BRL, Eggenste

Wachstumsmedien:	1x Medium	
	10% FCS	
	1% Glutamin	
	1% Penicillin/Streptomycin	
Infektionsmedien:	1x Medium	
	1% Glutamin	
	0,2% BSA (35%)	
	1% Penicillin/Streptomycin	
Plaquetest-Overlay:	2x MEM	25 ml
	Glutamin	0,5 ml
	BSA (35%)	0,30 ml
	1,8% Bacto-Agar	25 ml
	Penicillin/Streptomycin	0,5 ml

Zelllinien

MDCK II	Madin-Darby canine kidney: permanente Epithelzelllinie aus der Niere eines weiblichen Cockerspaniels
293T	humane embryonale Nierenzelllinie

Primäre Zellen

CEF	Hühnerembryofibroblasten
DEF	Entenembryofibroblasten
TEF	Putenembryofibroblasten

2.8 Bakterienkultur

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue

Medien:

LB Medium	10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl ad 1 l mit dH_2O
LB-Agar	2% Bactoagar in LB-Medium
NZY-Broth	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12,5 ml 1M $MgCl_2$, 12,5 ml $MgSO_4$, 10 ml 2 M Glucoselösung ad 1 l H_2O

2.9 Virusstämme

A/ostrich/Italy/984/2000
A/broiler breeder/Italy/1082/99

2.10 Puffer und Lösungen

Acetylierungspuffer	DEPC-PBS 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 0,25% Essigsäureanhydrid 0,3% konzentrierte Salzsäure
Agarosegel-Probenpuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 40% Saccharose
Anodenpuffer I	0,3 M Tris-HCl, pH 10,4 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% Methanol
DEPC-H_2O	dH_2O, 0,1% DEPC, ü.N. rühren + autoklavieren
DEPC-PBS	PBS def. , 0,1% DEPC, ü.N. rühren + autoklavieren

Entwicklungspuffer	Kodak™ Developer D-19
Eosin-Stammlösung (10x)	1 g Eosin 25 ml Ethanol 25 ml H_2O
Fixierungspuffer	Kodak™ Fixer
Hybridisierungspuffer	50% deionisiertes Formamid 10% Dextransulfat 1x Denhardt´s Solution 4x SSC 1 mg/ml Hefe-tRNA 0,1 mg/ml Fisch-DNA (immer frisch denaturieren) 10 mM EDTA
Katodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 9,4 40 mM Aminocapronsäure 20% Methanol
Kristallviolett-Gebrauchslösung	270 ml Formaldehyd (37%) 730 ml H_2O 1g Kristallviolett
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 6 g Glycerin 6 ml H_2O - ü.N. quellen lassen 12 ml TrisHCl (0,2M, pH 8,5) - auf 50-60°C erhitzen - zentrifugieren 15 min 4000 U Überstand + 10% DABCO
PBS def.	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na_2HPO_4 0,2 g K_2HPO_4 ad 1 l mit dH_2O
PBS^{++}	wie PBS def. , mit 0,1 g $MgCl_2$, 0,13 g $CaCl_2$
Prähybridisierungspuffer	50% deionisiertes Formamid 4x SSC
Proteinase K-Puffer	DEPC-H_2O 0,1 M Tris-HCl 50 mM EDTA pH 8,0 0,2 µg/ml Proteinase-K

2x Proteingel-Probenpuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 4% SDS 20% Glycerin 0,1 M DTT 0,04% Bromphenolblau
RNase-Puffer	10 mM Tris7HCl, pH 7,6 0,5 M NaCl 1 mM EDTA 20 µg/ml RNase A 1 U/ml RNaseT_1
Sammelgel 4%ig	1,2 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS 3 ml H_2O 0,65 ml 30% Acrylamid/ 2% Bisacrylamid 50 µl 10% APS 7 µl TEMED
10x SDS Proteingelpuffer	0,03 M SDS 1,25 M Tris-HCl, pH 7,4 1,92 M Glycin ad 1 l H_2O bidest.
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TBE-Puffer pH 8,3 (10x)	108 g Tris 55 g Borsäure 9,3 g EDTA ad 100 ml mit dH_2O
Trengel 10%ig	2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS 3,9 ml H_2O 3,4 ml 30% Acrylamid/ 2% Bisacrylamid 50 µl 10% APS 5,5 µl TEMED
TSS-Puffer	85% LB-Medium 10% (w/v) PEG 8000 5% (v/v) DMSO 50 mM $MgCl_2$ pH 6,5 , steril filtrieren

2.11 Geräte

Blotapparatur	Keutz, Reiskirchen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
ODYSSEY® Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
PCR-Cycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg

pH-Meter		
Photometer, Gene Quant pro		Amersham Biosciences, Braunschweig
Protein-Gelapparatur		Keutz, Reiskirchen
Thermocycler Primus 96 advanced		PeqLab, Erlangen
Thermomixer compact		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultraschallgerät		Bandelin Sonorex
Zentrifugen	*Avanti J-26 XP*	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	Minifuge T	Heraeus-Instruments, Hanau
	Multifuge 3 S-R	Heraeus-Instruments, Hanau

3. Methoden

3.1 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Die meisten Influenzaviren lassen sich in elf Tage alten, embryonierten Hühnereiern vermehren, so dass die zu entnehmende Allantoisflüssigkeit infizierter Eier als Virus-Stammlösung dienen kann. Dazu wurden zunächst die zu infizierenden Hühnereier durchleuchtet, um festzustellen, ob sich im Inneren ein Embryo befindet. Im nächsten Schritt wurden die Eier mittels einer Jodlösung im Bereich der Luftblase desinfiziert und dort vorsichtig ein kleines Loch gebohrt, um mit einer Spritze das Ei mit der Virussuspension zu inokulieren.
Den Eiern wurden jeweils 1000 pfu (*plaque-forming-units*) einer Virussupension (in PBS_{def}) in die Allantoishöhle injiziert. Dies geschieht mit einer Kanüle der Größe 0,55 x 25mm, um bei vollständigem senkrechtem Einführen exakt in die Allantoisflüssigkeit zu treffen. Die Öffnung wurde nach Infektion mit Ponal-Klebstoff verschlossen. Die infizierten Eier wurden anschließend für mindestens 48h in den 37°C-Inkubator mit 80% Luftfeuchtigkeit gestellt.
Um eine blutfreie Entnahme der benötigten Allantoisflüssigkeit zu ermöglichen, wurden die Eier nach 48h für vier Stunden bei 4°C gelagert, was zu einer Kontraktion der Blutgefäße führte. Nach Öffnung des Eies wurden Embryo und Dottersack mit dem Stiel eines kleinen Plastiklöffels vorsichtig an die Seite gedrückt, um möglichst gut an die Allantoisflüssigkeit zu gelangen. Diese wurde mit einer 10ml-Spritze und einer Kanüle mit einer Größe von 1,2 x 40mm aus dem Ei gezogen. Nachdem der Virustiter mittels eines HA-Tests (siehe 3.3) bestimmt wurde, teilte man die Flüssigkeit in Einfrierröhrchen (à 200µl) auf und lagerte diese bei –80°C.

3.2 Virusvermehrung in MDCK-II Zellen

Als Alternative zum Hühnerei bietet sich die Möglichkeit, Influenzaviren in Säugetierzellkulturen zu vermehren. In diesem Fall wurden MDCK-II Zellen verwendet. Hierbei wurden in einer 75 cm² Flasche konfluent gewachsene MDCK-II Zellen mit PBS^{++} 0,2% BSA gewaschen und anschließend mit 1000 pfu infiziert. Nach ca. 48h wurde der HA-Titer, wie in 3.3 beschrieben, bestimmt und der Überstand als Aliquots bei -80°C eingefroren.

Der exakte Titer infektiöser Partikel in der Lösung wurde anschließend über einen Plaquetest bestimmt.

3.3 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Influenzaviren besitzen das Oberflächen-Glykoprotein Hämagglutinin, welches an zelluläre endständige Neuraminsäuren bindet. Durch dieses Protein sind sie auch in der Lage, an Erythrozyten zu adsorbieren. Aufgrund dieser Fähigkeit entstehen in einer Virus-Erythrozytensuspension Vernetzungen von Viren und Erythrozyten (Hämagglutination). Bei zunehmenden Virusverdünnungen und gleich bleibender Erythrozytenkonzentration unterbleibt ab einer kritischen Viruskonzentration die Hämagglutination. Dadurch kann eine quantitative Aussage über die entsprechende Viruskonzentration getroffen werden. Eine so genannte Hämagglutinationseinheit (HAU) ist der reziproke Wert der Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine Hämagglutination erfolgt und ist damit ein Maß für den Virustiter.

Die Verdünnung der Virussuspension erfolgte in 2er Verdünnungsschritten auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte mit V-förmiger Vertiefung. Zunächst wurden ab dem zweiten Well 50µl PBS_{def} vorgelegt. 100µl der Virussuspension wurden ins erste Well pipettiert. Aus diesem Well wurden 50µl Virus entnommen, in die nächste Vertiefung gegeben und resuspendiert. Die Verdünnungsreihe setzte sich fort, indem 50µl aus der letzten Verdünnung ins nächste Well gegeben wurden. Aus dem letzten Well wurden 50µl verworfen.
Zu den einzelnen Virusverdünnungen wurden nun 50µl einer 1%igen Hühnererythrozytenlösung gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit dieser Virus-Erythrozytensuspension bei 4°C konnten in einzelnen Wells Agglutinationen festgestellt werden. Nicht-agglutinierte Erythrozyten sedimentierten und bildeten so genannte „Knöpfchen“ auf dem Boden der Wells.

3.4 Plaquetest

Diese Methode dient der quantitativen Bestimmung infektiöser Viruspartikel in einer Virussuspension. Das Grundprinzip beinhaltet, dass eine Verdünnungsreihe des Ausgangsvirus auf eine Zellkultur wie beispielsweise MDCKII-Zellen inokuliert und

anschließend durch Zusatz von Agar verfestigt wird. Der Agar ermöglicht den Viren zwar die Ausbreitung auf benachbarte Zellen, verhindert aber, dass Viren weiter entfernte Zellen durch Diffusion im Medium infizieren können.
Wenige Tage nach Infektion sind so genannte Plaques sichtbar. Plaques sind voneinander abgrenzbare Bereiche abgestorbener Zellen. Jeder Plaque geht durch die Infektion eines einzigen Virus hervor. Der Plaquetiter einer Virussuspension wird in *plaque-forming units* (pfu) /ml angegeben.

Am Vortag wurden hierzu MDCKII-Zellen in vierfacher Verdünnung auf 6 bzw. 12 Well-Platten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. MDCKII-Zellen wurden in Minimal Essential Medium (MEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die konfluenten Zellen zunächst mit PBS^{++} 0,2% BSA gewaschen und anschließend mit einer Verdünnungsreihe einer Virussuspension infiziert. Die Verdünnungsreihe wurde in 10er Schritten durchgeführt. Die Infektion der MDCKII-Zellen fand mit jeweils 333µl (6 Well-Platte) bzw. 200µl (12 Well-Platte) pro Well der entsprechenden Virusverdünnung für eine halbe Stunde (90 Minuten für NS1-Mutanten) im 37°C-Inkubator statt. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die infizierten Zellen zweimal mit PBS^{++} 0,2% BSA gewaschen, bevor diese mit jeweils 3ml bzw. 1,25ml Plaquetest-Overlay (s. 2.7) überschichtet wurden. Nach Erkalten der Agarschicht wurden die Zellen für weitere 3 Tage bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden zur Fixierung und Anfärbung der Zellen je 3ml bzw. 1,5ml Kristallviolettlösung (siehe 2.10) in jedes Well pipettiert. Kristallviolett färbt nur lebende Zellen an, die durch die Virusinfektion abgestorbenen Zellen blieben farblos. Nach ca. 12 Stunden wurde die Färbelösung abgesaugt, und die Agarschicht wurde vorsichtig mit einem Spatel aus den Wells herausgeholt. Um verbliebene Agarreste zu entfernen, wurden die einzelnen Wells mit entionisiertem Wasser ausgewaschen. Zuletzt wurden die 6 Well- bzw. 12 Well-Platten bei Raumtemperatur für 24h getrocknet und die Plaques ausgezählt.

3.5 Zellkulturmethoden

In dieser Arbeit wurden CEF (Hühnerembryofibroblasten), DEF (Entenembryofibroblasten), TEF (Putenembryofibroblasten), 293T (Humane embryonale Nierenzellen) und MDCK-II (Madin-Darby canine kidney, Nierentubulus des Hundes) als Zellsysteme für die gegebenen

Versuche verwendet. 293T und MDCK-II lagen als permanente Zelllinie vor, während CEF, DEF und TEF als primäre Zelllinie kurz vor den Versuchen isoliert oder aufgetaut wurden.
Als Medium für 293T, CEF, DEF und TEF diente 1x DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium) mit 10% FCS (fötales Kälberserum), 1% P/S (Penicillin und Streptomycin) und 1% Glut (L-Glutamin). MDCK-II benötigten als Medium 1x MEM (Minimum Essential Medium) mit 10% FCS, 1% Glut und 1% P/S.

3.5.1 Herstellung von primären Zellen

Die Herstellung der primären Zellen aviären Ursprungs (CEF, DEF und TEF) erfolgt aus 11-13 Tage alten Embryonen. Diese wurden 11 bzw. 13 Tage lang bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit zwei bzw. vier täglichen Drehungen um 180° bebrütet. Um zunächst an den Embryo zu gelangen wurden die Eier im Bereich der Luftblase desinfiziert. Die Eischale sowie die Eihaut wurden nach dem Öffnen des Eies, am oberen Ende vorsichtig mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt. Der Embryo konnte nun am Hals aus dem Ei herausgezogen und in eine Gewebekulturschale überführt werden. Der Kopf wurde abgetrennt, der restliche Torso in einen Schnabel-Kolben gegeben und zweimal mit je 200ml 1x GKN-Puffer gewaschen. Anschließend nahm man den Torso in 300ml 1x GKN-Puffer mit 2,5% Trypsin (1:10) auf und ließ ihn zweimal für jeweils 40min bei 100rpm auf dem Magnetrührer rühren. Durch die Zugabe von Trypsin lösten sich langsam die Fibroblasten von den Embryonen ab. Der Überstand wurde durch einen Gazetrichter gefiltert, in Zentrifugenbecher gleichmäßig abgefüllt und für 10min bei 2000rpm und Raumtemperatur in der Minifuge zentrifugiert. Während dieses Vorgangs setzten sich die isolierten Zellen auf dem Boden des Zentrifugenbechers ab. Diese wurden nach Abschütten des Überstands in 20ml des entsprechenden Mediums aufgenommen, in $75cm^2$-Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C, 5% CO_2 und konstanter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

3.5.2 Passagieren von Zellkulturen

Um eine stabile Zelllinie aufrecht zu erhalten, wurden die permanenten Zellkulturen alle drei bis vier Tage in 75 cm^2 Flaschen passagiert. Vor der Passage wurden Medium, Trypsin und PBS_{def} auf 37°C im Wasserbad erhitzt. Der Überstand der Zellkultur wurde abgegossen, die

Zellen mit 20 ml PBS_{def} gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA hinzu gegeben. MDCK-II Zellen wurden für ca. 20 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Bei 293T, CEF, DEF und TEF wurde das Trypsin vor der Inkubation abgegossen, und die Inkubation erfolgte nur für ca. 3-5 Minuten. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und je nach Bedarf auf Flaschen oder Schälchen verteilt. Zur Regeneration und weiterem Wachstum wurde die Zellkultur bei 37°C, 5% CO_2 und konstanter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Umsetzfaktoren:

Zellart	Passage für 1 Tag	Passage für 2 Tage	Passage für 3 Tage
293T	1 : 2	1 : 6	1 : 12
MDCK-II	1 : 3	1 : 10	1 : 30
CEF	1 : 5		
DEF	1 : 5		
TEF	1 : 5		

3.5.3 Lagerung von Zellkulturen (einfrieren/auftauen)

Zur schnelleren und einfacheren Handhabung von Zellkulturen lassen sich diese einfrieren und bei Bedarf wieder auftauen und weiter verwenden.
Hierzu wurden die Zellen mit PBS_{def} gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA abtrypsiniert und in 5 ml Medium (1x DMEM, 10% FCS, P/S, Glut) aufgenommen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000U wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 5,3 ml des identischen Mediums resuspendiert. Als Gefrierschutzmittel zur Kryokonservierung wurden jeweils 750 µl steriles DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugegeben und je 1,5 ml der Zellsuspension auf vier Einfrierröhrchen verteilt. Zum Einfrieren wurden die Röhrchen über Nacht in einem Isopropanoltank bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.
Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellen dem Stickstofftank entnommen und direkt bei 37°C inkubiert, bis die Zellen vollständig aufgetaut waren. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und mit dem entsprechenden Medium (1x DMEM, 10% FCS, P/S, Glut) in Plastikgefäße (6 cm Schälchen; 75 cm² Flaschen) nach Bedarf verteilt. Die Zellen wurden im

Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und konstanter Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das verbliebene DMSO zu entfernen, und die Zellkultur erneut bei 37°C inkubiert.

3.6 Isolierung viraler RNA

Zur Isolierung viraler RNA aus Allantoisflüssigkeit und Zellüberständen wurden die drei Kits „RNeasy® Mini Kit" (Qiagen), „High Pure RNA-Isolation Kit" (Roche) und „QIAamp® Viral RNA Mini Kit" (Qiagen) verwendet.
Bei allen Kits wird die Probe zuerst lysiert und RNasen inaktiviert. Die RNA wird an eine Membran gebunden, Kontaminationen durch mehrere Waschschritte entfernt und die RNA in RNase freiem Puffer eluiert.
Die Isolierung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.7 Klonierung mittels BD In-Fusion ™ Dry-Down PCR Cloning Kit

Das BD In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit ermöglicht es, PCR-Produkte in jedes Plasmid (Vektor) zu klonieren, ohne dass dafür Restriktionsenzyme, Ligasen oder Dephosphorylierungen notwendig sind. Die einzige Voraussetzung ist die Verwendung von Primern in der PCR, die 15 Basen homolog zu den Enden des verwendeten Vektors sind. Das BD In-Fusion ™ Enzym erzeugt einzelsträngige Regionen in den homologen Bereichen und fusioniert anschließend das PCR-Produkt in den Vektor. Die Klonierung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.7.1 Reverse Transkription

Mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) wird die einzelsträngige RNA mit Hilfe eines Primers in einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Verwendet wurde die Omniscript RT von Qiagen. Der verwendete Uni-12 Primer erlaubt die Herstellung der cDNA aller Influenza-spezifischen Genomsegmente in einem Ansatz. Der

Ansatz wurde nach dem anschließenden Schema erstellt und mittels eines PCR-Cyclers (Primus 96 advanced, PEQLAB) nach dem entsprechenden Cycler-Programm durchgeführt.

RT-Ansatz:

RNA	4 µl
Primer Uni12 (20 µM)	2 µl
RNase Inhibitor	1,5 µl
dNTP-Mix (25 mM/Nucleotid)	2 µl
10x Omniscript RT-Puffer	2 µl
Omniscript RT (2,5U/µl)	1 µl
H_2O (RNase-frei)	7,5 µl
Gesamtmenge	20 µl

Cycler-Programm:

Elongation	37°C	60 min
Inaktivierung	93°C	3 min

3.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Plasmid-abhängigen Primern

Bei der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen (SAIKI et al., 1988). Das Prinzip beruht auf der Denaturierung der Template-DNA, wodurch es zur Trennung der beiden DNA-Stränge kommt. Im folgenden Annealing-Schritt hybridisieren Primer an die Einzelstrang-DNA-Bereiche, und es erfolgt im Elongationsschritt die Synthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Bereichs durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses Zyklus wird das DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt.
Die DNA-Synthese wurde in dieser PCR von der hitzestabilen Ultra-Pfu DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus* katalysiert. Sie hat neben der 5'-3' Polymerisationsaktivität eine verbesserte 3´-5´-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (*proofreading*) erlaubt.
Ein Standard-PCR-Ansatz ist im Folgenden dargestellt:

Template-DNA/cDNA (-100 ng)	variabel
Fo-Primer (20 µM)	2 µl
Re-Primer (20 µM)	2 µl
10x Ultra-Pfu Polymerase-Puffer	10 µl
dNTP-Mix (25 mM/Nucleotid)	1 µl
Ultra-Pfu DNA-Polymerase	1 µl
ddH_2O	variabel
Gesamtmenge	100 µl

Die PCR erfolgte in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen in einem PCR-Cycler (*Primus*, MWG) nach folgendem Temperaturprogramm:

Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 s	35 Zyklen
Primer-Annealing	50-68°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min/kb Plasmid	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die optimale Annealing-Temperatur wurde durch die theoretische Schmelztemperatur T_m der Primer abzüglich 5°C festgelegt. Die Schmelztemperatur ist abhängig von Länge, dem GC-Gehalt der Oligonucleotide und der gewünschten Spezifität der Hybridisierung.

3.8 *In vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese wurde nach der Methode des Quik-Change™ Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt. Dies ist eine molekularbiologische Technik, mit der Punktmutationen, einzelne und multiple Aminosäureaustausche bei Plasmiden vorgenommen werden können. Von einem Ausgangsplasmid wird mittels zweier Mutageneseprimer, die an der beabsichtigten Stelle vom Template abweichen, eine PCR durchgeführt. Die Primer sollten etwa 15 Nukleotide an beiden Seiten der Mutationsstelle überragen und nach Möglichkeit mit Cytosin oder Guanin enden.

Bei der PCR entstehen Plasmide, die die gewünschte Mutation auf beiden Strängen tragen, allerdings auch Plasmide, welche nicht oder nur einzelsträngig mutiert sind. Um nur komplett mutierte Plasmide zu erhalten, wird die Probe einem DpnI Verdau unterzogen. DpnI ist eine Endonuklease mit der Zielsequenz (5´-G meth^{6}A TC-3´) und schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Aus *Escherichia coli* isolierte DNA ist DAM-methyliert. Das in der PCR amplifizierte, mutierte Plasmid trägt an die Primer anschließend zwei Nicks, die nach einer Transformation in *E. coli* durch das Bakterium repariert werden.

Durchführung:
In dieser Arbeit wurden die verwendeten Plasmide des 984- und 1082-Virus nach folgendem Schema mutagenisiert.

PCR-Mutagenese-Ansatz:

Plasmid-DNA (10-100 ng)	1 µl
Fo-Primer (20 µM)	1 µl
Re-Primer (20 µM)	1 µl
10x Pfu-Turbo Polymerase-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (25 mM/Nucleotid)	1 µl
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	1 µl
ddH_2O	40 µl
Gesamtmenge	50 µl

Cycler-Programm:

Denaturierung	94°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 s	18 Zyklen
Primer-Annealing	48-52°C	30 s	
Elongation	70°C	1 min/kb Plasmid	
Finale Elongation	70°C	5 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Proben wurden mit je 1 µl DpnI (5U/µl) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.9 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Gewisse Bakterienstämme zeigen natürliche Kompetenz und sind in der Lage, auch ohne Vorbehandlung freie DNA aufzunehmen. Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* können erst durch die Vorbehandlung mit geeigneten Chemikalien (Calciumchlorid, Magnesiumchlorid) und einen anschließenden Hitzeschock eine künstliche Kompetenz erhalten (Chung et al., 1989). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist im Detail jedoch nicht geklärt. Die DNA wird in Form von Plasmiden mit einer Ampicillinresistenz (β-Lactamase, bla) als Selektionsmarker in die Bakterien transformiert.

3.9.1 Herstellung TSS-kompetenter Bakterien

100µl *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) wurden in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am Morgen wurden von dieser Übernachtkultur 400 µl zu 20 ml LB-Medium in einem 200 ml Erlenmeyerkolben gegeben und bis zu einer OD von 0,5 bei 37°C geschüttelt (etwa 3 Stunden). Anschließend wurden die Bakterien direkt für 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterienlösung wurde gleichmäßig auf zwei Flaschen verteilt und 10 Minuten bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die zwei Pellets in je einem ml TSS-Medium resuspendiert. Zum Einfrieren wurde die Bakteriensuspension auf 20% Glycerin eingestellt, die Bakterien zu je 200 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und nach einer Schockgefrierung durch Ethanol mit Trockeneis bei -80°C gelagert.

3.9.2 Transformation TSS-kompetenter Bakterien

Die bei -80°C gelagerten kompetenten XL1-Blue-Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und 1-10 µl Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in einem auf 42°C voreingestellten Wasserbad zwei Minuten lang einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend weitere zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Um eine Ausbildung der auf den Plasmiden kodierten Resistenz zu gewährleisten wurden die Bakterien in 800µl LB-Medium gegeben und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurden je 100µl der Bakteriensuspension mit

einem Drigalsky-Spatel auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.9.3 Transformation von XL10-Gold Ultracompetent Cells

Um auch schwierige Plasmidkonstrukte erfolgreich zu transformieren wurden kompetente Bakterien (XL10-Gold Ultracompetent Cells) von Stratagene verwendet, welche sich durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnen. Es wurde hierbei nach Herstellerangaben vorgegangen.

3.10 Bakterien-PCR

Durch diese Methode ist es möglich, in der Transformation positive Klone direkt mittels PCR zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Durchführung:
Mit einem sterilen Holzzahnstocher wurden Kolonien von einer Platte gepickt und in den in der unten folgenden Tabelle angegebenen Ansatz resuspendiert. Ein Teil der Kolonie wurde in 5 ml flüssigem LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht angezüchtet, um bei positiver Transformation eine Plasmidpräparation durchzuführen. Nach der Resuspendierung wurde die Probe in einem PCR-Cycler auf 94°C erhitzt, um die Plasmide freizusetzen, und anschließend ein PCR-Programm durchgeführt.

PCR Ansatz:

Fo-Primer (20 µM)	0,5 µl
Re-Primer (20 µM)	0,5 µl
10x Taq Polymerase-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (25 mM/Nucleotid)	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,25 µl
ddH_2O	20,5 µl
+ 1 Bakterienkolonie (gepickt)	
Gesamtmenge	24,75 µl

Cycler-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	93°C	30 s	28 Zyklen
Primer-Annealing	52°C	30 s	
Elongation	70°C	2 min	
Finale Elongation	70°C	10 min	

3.11 Restriktion von DNA-Fragmenten

Beim so genannten Restriktionsverdau werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Dies sind Enzyme, die die Phosphodiesterbindungen im Innern eines DNA-Moleküls an genau definierten Stellen hydrolysieren. Sie erkennen hierbei eine spezifische Sequenz von meist vier bis acht Nukleotiden mit Palindrom-Struktur.

Durchführung:
Etwa 200 ng Plasmid-DNA wurden mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Restriktionsenzym, 10fach-Puffer und, falls angegeben, BSA (bovine serum albumine) für drei Stunden bei dem Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert und gegebenenfalls für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

3.12 Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Minipräparation und Maxipräparation sind molekularbiologische Methoden zur Gewinnung von Plasmiden aus Bakterienkulturen. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Kulturvolumina wurde das Qiaprep8® Miniprep Kit verwendet, für die Isolierung aus großen Kulturvolumina das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit. Beide Kits beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) der bakteriellen Zellen. Bei der Minipräparation schließt eine Adsorption der DNA an eine Silica-Membran unter hohen Salzkonzentrationen an. Nach einem Waschschritt zur Entfernung von Endonukleasen und Salzen wird die DNA in EB-Puffer oder Wasser eluiert. Bei der Maxipräparation schließt jedoch an die Lyse die Auftrennung über Anionen-Austauscher-Membranen unter niedrigen Salz- und pH-Konzentrationen an. Ein Waschschritt folgt unter Mediumsalzbedingungen

wonach die DNA unter Hochsalzbedingungen eluiert und anschließend durch Isopropanol-Fällung entsalzt und aufgereinigt wird.
Die genaue Durchführung ist dem beiliegenden Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3.13 Virusrescue

Die Herstellung der für diese Arbeit benötigten rekombinanten Influenza A-Viren erfolgte mittels der Methode nach Neumann (Neumann et. al., 1999). Dazu werden 293T Zellen mit acht Plasmiden transfiziert, die für je ein Gen des Influenzavirus unter Kontrolle des humanen RNA-Polymerase I Promotors kodieren. Nach Transkription dieser Plasmide entstehen die acht viralen RNAs (vRNAs). Zur Erstellung infektiöser Virionen wird eine RNA abhängige RNA-Polymerase benötigt. Daher werden zusätzlich zu den acht Plasmiden noch vier Expressionsplasmide transfiziert, die unter der Kontrolle eines Polymerase II Promotors stehen. Diese beinhalten die Gene für die Polymerasegene und das Nucleoprotein des Virus A/WSN/33. Nach Bildung der vRNAs und des Polymerasekomplexes erfolgt der vollständige Replikationszyklus, bei dem infektiöse Virionen entstehen. Da sich 293T-Zellen zwar gut transfizieren lassen, jedoch in ihnen nur eine geringe Virusvermehrung stattfindet, erfolgt im Anschluss eine Infektion von MDCK-II Zellen, in denen Influenzaviren zu hohen Titern replizieren.
In dieser Arbeit wurde der Virus-Rescue in Mischkultur verwendet. Bei dieser Methode transfiziert man eine Mischkultur aus 293T Zellen und MDCK-II Zellen, wodurch den in 293T Zellen entstandenen Viren eine direkte Infektion der MDCK-II Zellen ermöglicht wird und eine gute Vermehrung erfolgt.

Durchführung:
Am Vortag wurden 293T Zellen 1:2 und MDCK-II Zellen 1:3 in neue Flaschen umgesetzt. Zur Herstellung der Mischkultur wurden MDCK-II Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend zweimal mit 2,5 ml Trypsin/EDTA gespült. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen und die Zellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Kurz vor dem Ablösen der MDCK-II Zellen wurden die 293T Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA gespült. Das Trypsin wurde sorgfältig abgegossen und die Zellen für ca. 3 Minuten in den Brutschrank gestellt, bis sie sich gelöst hatten. Die gelösten MDCK-II Zellen wurden in 9 ml OptiMEM resuspendiert. Je 3 ml wurden zu den 293T Zellen gegeben. Zu der

Mischkultur wurden noch 37 ml OptiMEM gegeben, und anschließend je 4 ml auf 6cm-Schälchen verteilt. Im Brutschrank wurde die Mischkultur bei 37°C über Nacht für maximal 16 Stunden inkubiert.

Für die Transfektion wurde ein Ansatz aus den 7 PolI und 1 pHH21 Plasmid sowie den 4 Expressionsplasmiden zu je 1 µg jedes Plasmids erstellt. Die Ausnahme bildete das PA-Expressionsplasmid, von welchem nur 0,2 µg zu dem Ansatz pipettiert wurde. Die Ansätze wurden auf Eis in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend je 250 µl OptiMEM (P/S) zugegeben. Zusätzlich wurden pro Ansatz 230 µl OptiMEM (P/S) mit 20 µl Lipofectamin in einem extra Reaktionsgefäß vermischt. Alle Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden in die Reaktionsgefäße (mit 250 µl Plasmide/OptiMEM) 250 µl des Lipofectamin/OptiMEM Ansatzes gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Mischkulturen vom Vortag wurden während der Inkubationszeit einmal mit PBS_{def} gewaschen. Anschließend wurde 3,5 ml 37°C warmes OptiMEM (P/S) zu jedem Schälchen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz in ein 6cm-Schälchen mit Mischkultur gegeben.

Die Zellen wurden im Brutschrank für 10-16 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Das alte Medium wurde abgesaugt und 4 ml OptiMEM (P/S) zu den Kulturen gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 24-48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2. Während dieser Zeit wurden infektiöse Viren in das Medium freigesetzt, die zur Weiterpassage genutzt wurden.

MDCK-II Zellen in 6cm Schälchen wurden einmal mit PBS^{++}, 0,2% BSA gewaschen. Zu diesen Zellen wurde 1 ml des Mischkulturüberstandes, sowie 3 ml Medium (MEM 0,2% BSA, 0,5% FCS, Glut, P/S) gegeben. Nach 2-4 Tagen waren alle Zellen durchinfiziert und ein ausreichender Titer für die Produktion eines Virus-Stocks in Hühnereiern oder MDCK-II Zellen erreicht.

3.14 Plaquereinigung

Um nach dem Virusrescue ein klonales Virus für weitergehende Versuche zu erhalten, wurden nacheinander zwei Plaquereinigungsschritte durchgeführt.

Durchführung:
Es wurde ein Plaquetest (siehe 3.4) ohne Kristallviolettfärbung durchgeführt und anschließend wird ein einzelner Plaque mit der darüber liegenden Agarschicht ausgestochen. Dieser Plaque wurde in 1 ml PBS^{++} 0,2%BSA bei 4°C über Nacht gelöst. Das gelöste Virus wurde anschließend im embryonierten Hühnerei oder in Zellkultur vermehrt (siehe Kap. 3.1 oder 3.2).

3.15 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger, auch bezeichnet als Kettenabbruchmethode, durchgeführt. Ähnlich der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzung aufgeschmolzen und von einem Primer ausgehend ein komplementärer Strang durch eine DNA-Polymerase aufsynthetisiert. In dem Reaktionsansatz befinden sich alle vier Desoxynucleotide sowie mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Didesoxynucleotide (ddNTPs). Jedes der vier verschiedenen ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzmarker versehen. Der Einbau eines ddNTPs führt zu Kettenabbruchprodukten, die in einer Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und zur Fluoreszenz angeregt werden. Über das Fluoreszenzsignal und die Stranglänge wird die Basensequenz der Ausgangs-DNA als Chromatogramm ausgegeben.

Durchführung:
Die DNA-Konzentration bei Plasmiden für eine Probe sollte bei 200 ng liegen, die Konzentration für PCR-Produkte bei 100 ng. Ein Primer wurde in der Konzentration von 10 pmol hinzugegeben und das Gemisch auf ein Endvolumen von 6 µl mit H_2O aufgefüllt. Die Proben wurden mit einem Megabace-Sequenzierer (Amersham Bioscience) sequenziert.

Sequenzierprimer:
Je nach Gen wurde eine unterschiedliche Anzahl an Primern eingesetzt. Da das NS-Gen das kürzeste DNA-Fragment im Influenza-Genom ist, wurde hierfür nur ein Forward- und ein Reverse-Primer benötigt. Das HA-Gen benötigte weitere innen liegende Primer.

3.16 Präparation von Embryonen und Herstellung von Gefrierschnitten

11-13 Tage alte, embryonierte Eier wurden wie in 3.1 beschrieben infiziert und frühestens 36 Stunden nach Infektion kurz auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden Allantoisflüssigkeit und Embryonen entnommen. Den Embryonen wurden Kopf, Flügel und Beine mit einer Schere abgetrennt und der Rumpf danach für maximal 10 Sekunden in auf –50°C gekühltes Isopentan getaucht und somit schockgefroren. Die schockgefrorenen Embryonen können anschließend bei –80°C bis zu zwei Jahre lang aufbewahrt werden.

Am Kryotom (Frigocut 2800-N, Fa. Reichert-Jung) können von den so präparierten Embryonen bei –20°C, 20 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt werden. Diese werden anschließend auf SuperFrost-Objektträger (Fa. Menzel Gläser) aufgebracht und können nach Lufttrocknung wie die schockgefrorenen Embryonen bei –80°C gelagert werden.

3.17 *In situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung lässt sich unter anderem mRNA oder virale RNA in Zellen und Geweben spezifisch darstellen. Für die spezifische Erkennung werden RNA-Sonden in komplementärer Orientierung zu der zu detektierenden RNA verwendet. Diese Sonden lassen sich durch den Einbau von ^{35}S-markiertem dUTP kennzeichnen und können so im Gewebe mittels einer speziellen Photoemulsion dargestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die *in situ* Hybridisierung zur Detektion viraler RNA in Gefrierschnitten von Hühnerembryonen verwendet.

3.17.1 Herstellung der Sonde

Für die *in situ* Hybridisierung werden ^{35}S-markierte RNA-Sonden verwendet, da sie spezifisch mit der gewünschten Zielsequenz hybridisieren können. Diese Eigenschaft von RNA-Sonden beruht auf der großen Stabilität von RNA-Hybriden. Die RNA-Sonden können durch „run off“ *in vitro* Transkription hergestellt werden. Dazu kloniert man ein Fragment des

entsprechenden Gens in einen Transkriptionsvektor, so dass es von Promotoren für die T3- und T7-RNA-Polymerase umgeben wird. Vor der *in vitro* Transkription muss das Transkriptionskonstrukt durch einen Restriktionsverdau am Ende des klonierten Genfragments linearisiert werden. Nur so kann es effizient zur Herstellung von „run off" Transkripten kommen. Da die beiden Promotoren der RNA-Polymerasen rechts und links des Inserts liegen, können je nach Wahl RNA-Sonden in *sense* oder *antisense* Richtung synthetisiert werden. In dieser Arbeit soll die Ausbreitung des Virus in histologischen Schnitten dargestellt werden. Deshalb wird ein Transkriptionskonstrukt mit kloniertem Influenza-NP-Fragment verwendet. Die radioaktiv-markierten NP-Sonden erkennen spezifisch die Inluenza-NP-RNA und somit die Bereiche, in denen Virusreplikation stattfindet.

Ein NP-Fragment des FPV-Virus von 365 bp Länge lag bereits in dem Vektor pBluescript KS+ kloniert vor. Die *antisense*-RNA kann mit mRNA und cRNA hybridisieren. Sie ist daher später effizienter zu detektieren als die antisense-RNA, die nur mit vRNA hybridisieren kann. Aus diesem Grund wurden ausschließlich antisense-RNA-Transkripte verwendet.

5 µg des Vektor-Konstrukts wurden mit 15 Units des Restriktionsenzyms HindIII über Nacht bei 37°C linearisiert und mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend wurde die ^{35}S-dUTP-Lösung in der Speed-Vac eingedampft und der folgende Reaktionsansatz zugegeben.

Ansatz:

1 µg linearisiertes Plasmid	8 µl
DTT	1,5 µl
10x Transkriptionspuffer	1,7 µl
dNTP-Mix ohne UTP (25 mM/Nucleotid)	2,5 µl
RNase-Inhibitor	1,3 µl
T7-Polymerase	2 µl
Gesamtmenge	17 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die RNA-Sonden anschließend mit dem Roche High Pure RNA Isolation Kit aufgereinigt. Die Effizienz der ^{35}S-Markierung wurde per Szintillationsmessung bestimmt. Dafür wurden 2% jedes Säulendurchflusses entnommen, mit 2 ml Szintillationslösung versetzt und die vorhandene Radioaktivität bestimmt.

3.17.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Durch die Vorbehandlung wird das Gewebe fixiert und die zu detektierende RNA für die Sonde zugänglich gemacht. Die bei –80°C gelagerten Kryoschnitte wurden auf Raumtemperatur erwärmt und für 1 Stunde in 4%iger, frisch angesetzter Formaldehydlösung (in DEPC-PBS, pH 7,2) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal je 10 Minuten mit DEPC-PBS gewaschen und dann für 10 Minuten bei 37°C mit Proteinase K (0,2 µg/ml in Proteinase K-Puffer) behandelt. Nun wurden die Schnitte für 1 Minute in DEPC-Wasser getaucht und anschließend für 10 Minuten in 4%iger Formaldehydlösung nachfixiert. Es folgten zwei Waschschritte; zuerst in DEPC-PBS mit 0,1M Glycin und dann in DEPC-PBS. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen der RNA-Sonde an freie, positiv geladene Aminogruppen von Proteinen wurden die Schnitte für 10 Minuten in frisch angesetztem Acetylierungspuffer acetyliert. Die Präparate wurden ein weiteres Mal für 5 Minuten in DEPC-PBS gewaschen und durch kurzes Eintauchen in 50%igen und 70%igen Ethanol dehydriert. An dieser Stelle können die Schnitte nach Lufttrocknung bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert werden.

3.17.3 Hybridisierung

Zur Hybridisierung werden zunächst je 200 µl Prähybridisierungspuffer auf die vorbehandelten Schnitte gegeben. Diese werden mit einem Deckgläschen in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 55°C inkubiert. Während dessen wird der Ansatz für die Hybridisierung vorbereitet. Die Sonde sollte dafür auf $5x10^4$ cpm/µl in Hybridisierungspuffer verdünnt werden. Nach dem Abgießen des Prähybridisierungspuffers werden je 50 µl der Sondenlösung mittig auf jeden Schnitt gegeben. Anschließend werden Deckgläschen blasenfrei auf die Objektträger gelegt und mit elastischem Montagekleber umfahren und damit verschlossen. Die Inkubation erfolgt über Nacht für mindestens 16 Stunden. Vor Beginn der Posthybridisierung wurden die Objektträger vorsichtig vom Montagekleber befreit und die Deckgläschen anschließend in 2x SSC abgelöst. Die überschüssigen und unspezfisch gebundenen Sonden wurden durch Waschschritte mit zunehmender Stringenz entfernt. Dazu wurden die Schnitte für je 10 Minuten bei 37°C in 2x SSC und 1x SSC in DEPC-Wasser gewaschen. Beim folgenden RNase-Verdau für 1 Stunde bei 37°C wird sämtliche noch

vorhandene einzelsträngige RNA abgebaut. Die zu Doppelsträngen hybridisierten RNA-Sonden sind vor dem Verdau durch die RNase geschützt. Es folgten weitere Waschschritte von je 10 Minuten in 0,5x SSC und 0,2x SSC bei 37°C. Der letzte Waschschritt fand in 0,2x SSC bei 60°C für 1 Stunde in feuchter Kammer statt. Für weitere 2 Minuten in dH_2O und jeweils kurzem Eintauchen in 50%, 70% und 96% Ethanol sind die Schnitte nach Lufttrocknung bereit für die Visualisierung.

3.17.4 Visualisierung der gebundenen Sonde im histologischen Bild

Die getrockneten Objektträger wurden für 24 Stunden bei –20°C in einer Fotokassette mit aufgelegtem Röntgenfilm (BioMax MR™, Kodak) aufbewahrt. Nach der Entwicklung konnte anhand der Intensität der Schwarzfärbung beurteilt werden, wie lange die anschließend aufgetragene Photoemulsion (Kodak NTB2™) auf den Objektträgern verbleiben sollte. Die Beschichtung ist notwendig, um die radioaktive, gebundene Sonde mikroskopisch auf dem histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Die Photoemulsion muss vor dem ersten Gebrauch 1:1 mit Wasser verdünnt und ein paar Körnchen Waschpulver zur Herabsetzung der Oberflächenspannung zugesetzt werden. Sowohl das Wasser als auch die Photolösung müssen 1 Stunde lang bei 42°C inkubiert werden, um die gelartige Masse der Photoemulsion zu schmelzen. Die verdünnte Photoemulsion wird in 20 ml Aliquots in Szintillationsröhrchen abgefüllt und anschließend einzeln mit mindestens zwei Lagen Aluminiumfolie lichtdicht umschlossen. Die verdünnte Photoemulsion ist bei 4°C gelagert 6 Monate lang haltbar. Diese und die folgenden Schritte müssen entweder in absoluter Dunkelheit oder bei geeignetem Rotlicht (Safelight Filter No. 2™) durchgeführt werden, um eine vorzeitige Belichtung der Photoemulsion zu vermeiden. Die vorverdünnte Photoemulsion wurde in ein spezielles Gefäß (Hypercoat dipping vessel RPN 39™ Amersham Pharmacia, UK) umgefüllt. Nach einer 5 minütigen Wartezeit wurden die Objektträger in die 42°C warme gebrauchsfertige Emulsion getaucht und bis zur völligen Trocknung zusammen mit einer Schale hygroskopischer Silikagelkugeln über Nacht bei Raumtemperatur aufgestellt. In Objektträgerkästen sortiert werden die Schnitte für weitere 5-11 Tage bei 4°C bis zur Entwicklung aufbewahrt. Die Dauer der Exposition hing von der zuvor durch den aufgelegten Röntgenfilm (BioMax MR™, Kodak, USA) abgeschätzten Signalstärke der Hybridisierungsreaktion ab. Die beschichteten Schnitte werden danach 5 Minuten in speziellem Entwickler (D19™, Kodak, USA) inkubiert,

dann kurz in Wasser gespült und 10 Minuten in Fixierer (Rapid Fixer™, Kodak, USA) vollständig entwickelt. Die Photoemulsion ist bis auf die Stellen, die durch die Radioaktivität bestrahlt wurden, klar geworden. Die bestrahlten Stellen bleiben als schwarze Granula auf der entwickelten Photoemulsion sichtbar.

3.18 Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung

In HE-gefärbten Präparaten zeigen sich in der Mikroskopie durch Hämatoxylin gefärbte basophile Zellkerne und eosinophiles Zytoplasma. Die Erythrozyten erscheinen orange, und das übrige Gewebe ist rot bis violett abgestuft.

Die Schnitte werden vor Beginn der HE-Färbung für 1 Stunde gewässert, danach 30-60 Sekunden in saures Hämatoxylin getaucht und anschließend während 10 minütiger Wässerung zur Intensivierung und Fixierung der Färbung gebläut. Die Färbung mit Eosin erfolgt für 15-30 Sekunden, bevor die Objektträger dehydriert werden. Hierfür werden sie jeweils kurz in 70%, 80%, 90%, 96% Ethanol und zweimal für 3 Minuten in 100% Ethanol getaucht. Die Dehydrierung ist mit zwei fünfminütigen Schritten in Xylol abgeschlossen. Nachdem sich das Lösungsmittel verflüchtigt hat, werden die Schnitte zur Konservierung mit Entellan eingedeckelt.

3.19 Immunhistochemische Odyssey-Anfärbung von Schnitten

Durch diese Methode lassen sich Proteine in Zellen und Geweben spezifisch darstellen. Die eingefrorenen Schnitte der Embryonen wurden dazu an der Luft getrocknet und anschließend in einer Methanol/Aceton (1:1, -20°C) für 15min fixiert. Die Schnitte wurden dreimal 10min mit PBS_{def} gewaschen und anschließend für eine Stunde mit PBS_{def} 1% BSA geblockt. Der Erst-Antikörper (Anti-KP-Serum aus Kaninchen) wurde 1:250 in PBS_{def} 1% BSA verdünnt. Nach dem Blocken wurden jeweils 250µl der Erst-Antikörper Verdünnung auf die mit Fettstift umfahrenen Schnitte gegeben und diese bei Raumtemperatur für 2 Stunden leicht geschwenkt. Es folgten erneut drei Waschschritte mit PBS_{def} für je 10 min, bevor 250µl der Zweit-Antikörper Lösung (Anti-Kaninchen-800nm in PBS_{def} 0,1% Tween, 1% Milchpulver

1:1000 verdünnt) auf die Schnitte pipettiert wurden. Diese wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur und Abdunklung inkubiert. Die Schnitte wurden nach der Abnahme des Antikörpers nochmals dreimal für 10min mit PBS_{def} gewaschen. Auch dieser Schritt wurde abgedunkelt durchgeführt, bevor die Schnitte am Odyssey-Gerät eingescannt wurden (Fokus Offset: +1.0mm).

3.20 Immunhistochemische DAB-Anfärbung

Ziel dieser Methode ist es, die Virusinfektion in bestimmten Zellen und unter dem Lichtmikroskop farblich darzustellen. Bei dieser Methode wurden die eingefrorenen Embryoschnitte an der Luft getrocknet und anschließend in einer Methanol/Aceton (1:1, -20°C) für 15min fixiert. Zur Blockierung endogener Peroxidase wurden die Schnitte 15min in eine 1%ige H_2O_2-Lösung (in PBSdef) gelegt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal 10min mit PBS_{def} gewaschen und anschließend für eine Stunde mit PBS_{def} 1% BSA geblockt. Der Erst-Antikörper (Anti-KP-Serum aus Kaninchen) wurde 1:250 in PBS_{def} 1% BSA verdünnt. Nach dem Blocken wurden jeweils 250µl der Erst-Antikörper Verdünnung auf die mit Fettstift umfahrenen Schnitte gegeben und diese bei Raumtemperatur für 2 Stunden leicht geschwenkt. Es folgten erneut drei Waschschritte mit PBS_{def} für je 10 min, bevor 250µl der Zweit-Antikörper Lösung (Anti-Kaninchen-HRP (aus Ziege) in PBS_{def} 0,1% Tween, 1% Milchpulver 1:250 verdünnt) auf die Schnitte pipettiert wurden. Diese wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Abnahme des Antikörpers nochmals dreimal für 10min mit PBS_{def} (0,1%Tween) gewaschen.
Um den mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper unter dem Lichtmikroskop sichtbar zu machen, wurden 300µl einer FAST DAB-Lösung von Sigma-Aldrich auf die Schnitte gegeben. Durch die Reaktion mit Sauerstoff lagert sich DAB (3, 3'-Diaminobenzidin) auf dem Objektträger ab. Dieser braune Farbstoff entsteht an den Stellen, an dem die Peroxidase das H_2O_2 in H_2O und Sauerstoff umwandelt. Darüber kann indirekt Virusprotein nachgewiesen werden. Nach 5-30 minütiger Inkubation werden die Schnitte sorgfältig für 10min gewässert und anschließend einer HE-Färbung unterzogen (siehe 3.18).

3.21 Bestimmung der Mittleren Todeszeit (MDT) und der Egg Infectious Dose 50 (EID_{50})

Als Maß für die Virulenz von Influenzaviren gibt es verschiedene Kenngrößen, die sich auf die Schädigung von Hühnerembryonen beziehen.
Die MDT drückt den mittleren Todeszeitpunkt 11-13 Tage alter infizierter aviärer Embryonen aus. Sie wird in Stunden nach Infektion (h p.i.) angegeben. Pro Virus wurden jeweils 10 embryonierte Eier infiziert, die anschließend mehrmals täglich auf abgestorbene Embryonen untersucht wurden. Die Infektionsdosis sollte die niedrigst mögliche Virusverdünnung sein, bei der alle Embryonen sterben.
Die EID_{50} beschreibt die Virusdosis (angegeben in pfu, siehe 3.4) bei der genau die Hälfte der inokulierten Embryos infiziert werden. Dazu wurden 11 Tage alte aviäre Embryonen verschiedenen Viruskonzentrationen in 10er Verdünnungen beimpft und nach 48 Stunden die Allantoisflüssigkeit mittels HA-Test (3.3) auf Viruswachstum untersucht.

3.22 Western Blot

Beim Western Blot (Immunoblot) werden durch Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran elektrophoretisch transferiert und durch Antikörper nachgewiesen.

3.22.1 SDS-PAGE

Als Gelelektrophoresetechnik wurde die diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, bei der sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer Massenunterschiede auftrennen lassen (Laemmli, 1970). Bei der Probenvorbereitung wird SDS in Probenpuffer im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben. Die Probe wird anschließend 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Jedes SDS-Anion bindet an zwei Aminosäurereste der Proteine, was ihnen eine negative Ladung verleiht, die ungefähr proportional zur Masse ist.

Durchführung:
Zu Beginn wurden alle Komponenten der Gelkammer und Gießapparatur gereinigt, sowie das Gel nach folgendem Pipettierschema vorbereitet:

	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (4,5%)
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	3,4 ml	5,0 ml	0,75 ml
1,5M Tris/HCL + 0,4% SDS, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	---
0,5M Tris/HCL + 0,4% SDS, pH 6,8	---	---	1,3 ml
ddH2O	3,9 ml	2,3 ml	2,9 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5,5 µl	5,5 µl	7 µl

APS und TEMED wurden direkt vor dem Gießen des Trenngels hinzugegeben und die Gelschicht mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberkante zu erzeugen. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol abgenommen und APS sowie TEMED zu der vorbereiteten Sammelgellösung hinzugegeben, die Lösung über das Trenngel gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach ausreichender Polymerisationszeit wurde das Gel nun vertikal in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen des Kamms wurden die Taschen gespült und die Proben sowie 1µl PageRuler Prestained Protein Ladder Plus von Fermentas in die Taschen pipettiert. Anode und Kathode wurden angeschlossen, sowie eine Spannung von 100 Volt angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Farbbande der Lauffront aus dem Gel hinaus geflossen war.

3.22.2 Western Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Semi-Dry-Blot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können mittels Elektroblotting auf eine Nitrozellulose- (NC-) Membran transferiert werden. Dabei wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und binden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die NC-Membran.

Durchführung:
Als Vorbereitung für den Transfer wurden Filterpapiere zugeschnitten und mit den in der Tabelle angegebenen Puffern getränkt. Für den Semi-Dry-Blot wurden die Papiere, Membran und Gel zwischen zwei Graphitelektroden wie folgt geschichtet:

Kathode	
9 Filterpapiere	Getränkt mit Kathodenpuffer
SDS-Gel	
NC-Membran	Befeuchtet mit Anodenpuffer II
6 Filterpapiere	Getränkt mit Anodenpuffer II
3 Filterpapiere	Getränkt mit Anodenpuffer I
Anode	

Die für den Transfer benötigte Stromstärke lässt sich aus der Fläche des Gels berechnen (0,8 mA/cm²). Der Transfer erfolgte dementsprechend bei einer zu blottenden Membran für 75 Minuten bei 43 mA.

3.22.3 Detektion viraler Proteine auf Western Blots mittels Odyssey-Technik

Mittels des Odyssey Systems können mit einem Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte, an die Membran gebundene Antikörper bei der gegebenen Wellenlänge detektiert werden und die entsprechenden Banden mit einem Marker verglichen werden.

Durchführung:
Nach dem Semi-Dry-Blot wurde die Membran vorsichtig aus der Blotkammer genommen und bei 4°C über Nacht in PBS_{def} mit 10% Milchpulver geblockt. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal 10 Minuten mit PBS_{def} gewaschen und zusätzlich für eine Stunde in PBS_{def} mit 1% BSA geblockt. Nach dem Blocken wurde die Flüssigkeit abgegossen und der erste Antikörper in PBS_{def} mit 1% BSA für 90 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS_{def} wurde der zweite Antikörper (Infrarot-Fluoreszenz-markiert) in PBS_{def} mit 0,1% Tween, 1% Milchpulver verdünnt und für 90 Minuten zu der Membran gegeben. Die Membran wurde nochmals dreimalig mit PBS_{def} gewaschen. Am Odyssey-Gerät wurde die Membran eingescannt und einzelne Banden auf deren korrekte Laufhöhe und Intensität untersucht.

3.23 Zellkern-Zytoplasma Auftrennung

Zur Konzentrationsbestimmung des NS1-Proteins in Zellkern und Zytoplasma infizierter Zellen wurde eine Auftrennung mittels des „Nuclear Extraction Kits" von IMGENEX durchgeführt. Dabei wird mittels eines hypotonischen Puffers eine Zelllyse herbeigeführt und durch Abzentrifugieren der Zellkerne eine Fraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen wurden in einem Proteingel aufgetragen. Mittels Western-Blot-Verfahren konnten die Banden identifiziert und quantifiziert werden. (siehe 3.22.3)
Die Durchführung erfolgte nach dem im Benutzerhandbuch aufgeführten Kapitel V. NUCLEAR EXTRACTION KIT PROCEDURE A. Preparation of Nuclear Extract from Cells von IMGENEX.

3.24 Intrazellulärer Proteinnachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Proteinen mittels Immunfluoreszenz (Histochemische Fluoreszenz-Anfärbung) beruht auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Epitopen als Antigen-Antikörper-Reaktion. Dadurch lassen sich Antigene auf Zelloberflächen und in permeabilisierten Zellen nachweisen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. Im zweiten Schritt kann ein Sekundärantikörper, der mit einer fluoreszierenden chemischen Gruppe (z.B. Rhodamin) gekoppelt ist, diesen primären Antigen-Antikörper-Komplex detektieren. Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft, bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht (UV-Licht), Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren und so die markierten Antigene sichtbar zu machen.

Durchführung:
Konfluente Zellen wurden einen Tag vor Infektion in eine 24 Well-Platte mit 1 ml Medium/Vertiefung und einem Deckgläschen/Vertiefung ausgesät. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass die Zellen bei der Infektion noch nicht vollständig konfluent waren. Unmittelbar vor der Infektion wurden die Zellen mit 37°C warmem PBS^{++} gewaschen. Die Virussuspension wurde mit PBS^{++} bis zu einer MOI von 1 (ein infektiöses Virus pro Zelle) verdünnt. 500µl der Verdünnung wurden auf die Zellen gegeben und 30 min bei 37°C

inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS^{++} gewaschen und mit 1ml Infektionsmedium weitere 7,5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Überstand der 24-Well-Platten wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 500µl Aceton/Methanol (-20°C) 15 Minuten bei -20°C fixiert. Anschließend wurde mit 500µl PBS_{def} + 0,1% Triton X100 10 Minuten permeabilisiert und danach dreimal 15 Minuten mit PBS_{def} gewaschen. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C in PBS_{def} gelagert und am nächsten Morgen in PBS_{def} (1%BSA) eine Stunde geblockt. Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von NS1 aus Ziege (Santa Cruz Biotechnology) in PBS_{def} (1%BSA) 1:100 verdünnt, 50 µl mit je 1 µg DAPI auf gespannten Parafilm vorgelegt und das Deckgläschen kopfüber auf die Antikörperlösung gelegt. Nach zwei Stunden wurde das Deckgläschen zurück in die 24-Well-Platte gelegt und dreimal mit PBS_{def} 15 Minuten gewaschen. Währenddessen wurde der Rhodamin-gekoppelte Zweitantikörper in PBS_{def} (0,1% Tween, 1% Milchpulver) 1:500 verdünnt. 50 µl dieser Verdünnung wurden auf gespannten Parafilm vorgelegt. Nach dem Waschvorgang wurde das Deckgläschen kopfüber auf die zweite Antikörperlösung gelegt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS_{def} wurde das Deckgläschen kopfüber mit 15 µl Mowiol auf einem Objektträger fixiert.

Die Präparate wurden im Dunklen aufbewahrt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 ApoTome, Firma Zeiss) betrachtet und fotografiert.

3.25 Rezeptorbindungs-Assay

96-Well Platten wurden mit einer 0,1%igen (w/v) Fetuinlösung beschichtet. Fetuin ist ein polyvalentes Substrat, mit 8,7% gebundenen Neuraminsäuren (NeuS) auf der Oberfläche (unter anderem α2-3 und α2-6 gebunden). Die über Nacht beschichteten Platten wurden 30min mit 2-fachen Virusverdünnungen (in PBS_{def}) inokuliert, um die Bindung der Viren an α2-3 bzw. α2-6 verlinkten NeuS zu gewährleisten. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Aktivität der viralen Neuraminidase zu inhibieren. Die Platten wurden anschließend mit PBS_{def} (0,01% TWEEN 20) gewaschen. Durch Zugabe von Methanol/Aceton (1:1, -20°C) werden die gebunden Viren an der Fetuin-bedeckten Oberfläche fixiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS_{def} (0,01% TWEEN 20) wurden entweder biotinylierte Sambucus nigra oder Maackia amurensis Lektine zugegeben (1:1000 in PBS_{def}, 1% BSA). Sambucus nigra Lektin erkennt spezifisch α2-6 gebundene NeuS, während Maackia amurensis Lektin an α2-3 verlinkte NeuS bindet. Nach erneutem Waschen mit PBS_{def} (0,01% TWEEN 20) wurden die

Platten mit Streptavidin (800nm-Fluoreszenz-markiert) inkubiert und nach drei weiteren Waschschritten mit PBS_{def} am LI-COR (USA) Odyssey Infrared Imaging System eingescannt und die Intensität der Fluoreszenz quantifiziert. Als Maß für die Effizienz, mit der die untersuchten Viren an α2-3 bzw. α2-6 verlinkte Neuraminsäuren binden, wurde die maximale Bindungsverdünnung (BDmax) angegeben. Sie entspricht der höchsten Verdünnungstufe, bei der noch mindestens 95% der entsprechenden Neuraminsäuren von dem Hämagglutinin des Virus gebunden werden.

3.26 Virusfreisetzungs-Assay

Für eine effiziente Virusausbreitung ist es notwendig, dass sich neugebildete Viren von bereits infizierten Zellen lösen können. Um die erzeugten Virusmutanten auf diese Eigenschaft zu untersuchen, wurden konfluent gewachsene CEF und DEF (in 6cm-Schälchen) mit einer MOI von 3 für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS^{++}, 0,2% BSA gewaschen. Der dritte Waschschritt wurde mit PBS^{++} (pH 5,0) durchgeführt, um verbleibende, nicht endozytierte Viren zu inaktivieren. Nach Zugabe von 4 ml DMEM, 0,2% BSA wurden die Zellen 24h bei 37°C und 5%CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen (24h-Überstand) und die Zellen wurden erneut mit PBS^{++}, 0,2% BSA gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml DMEM, 0,2% BSA wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt (Zellsuspension). Der 24h-Überstand, sowie die Zellsuspension wurden für 3 Minuten mit Ultraschall behandelt, um gebundene Viren von den Zellen und Zelltrümmern abzulösen. Die Proben wurden anschließend mittels Plaquetest (siehe 3.4) auf die Menge neugebildeter Viruspartikel untersucht und miteinander verglichen.

3.27 Interferoninduktion und Interferon-β-mRNA-spezifische RT-PCR

Eine Virusinfektion bewirkt in Zellen normalerweise eine Induktion von Typ-I-Interferon. Influenza A-Viren sind durch das Interferon-antagonisierende Protein NS1 in der Lage, diese Induktion und somit den Übergang der Zelle in einen antiviralen Status zu hemmen. Um diesen Effekt nachweisen zu können, wurden CEF-Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert, und 7,5h nach Infektion wurde die RNA aus den infizierten Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen (siehe 3.6) isoliert. Als Positiv-Kontrolle wurden CEF mit PolyIC (5µg/$2{,}5x10^6$

Zellen) transfiziert (Lipofectamin 2000), was zu einer Aktivierung der Interferon-β Produktion führt. Zur Amplifikation der Interferon-β mRNA wurde eine RT-PCR (OneStep RT-PCR Kit von Qiagen) nach Herstellerangaben mit den folgenden Primern durchgeführt: GenBank accession no. NM_ 001024836, Primer von Position 194 bis 213 und 398 bis 379. Als RNA-Mengenkontrolle wurden des Weiteren Hühner-β-Aktin-mRNA-spezifische Primer (GenBank accession no. CHKBACTN, Primer von Position 866 bis 886 und 1278 bis 1259). in der RT-PCR eingesetzt. Die Produkte wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Behandlung unter UV-Licht fotografiert. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageJ 1.38x vom National Insitute of Health (USA) bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Überblick

In der vorliegenden Arbeit sollten Pathogenitätsdeterminanten von Influenza A-Viren anhand des hochpathogenen aviären Influenzavirus A/ostrich/Italy/984/00 (984) und der niedrigpathogenen Variante A/chicken/Italy/1082/99 (1082) herausgearbeitet werden. Diese Viren wurden während einer Influenza-Epizootie in Italien isoliert, in deren Verlauf der hochpathogene Phänotyp aus Viren niedriger Pathogenität hervorgegangen war (Banks et al., 2001). Aufgrund von Sequenzanalysen konnten Mutationen in annähernd jedem viralen Gen, abgesehen von M2, NS2 und PB1-F2, nachgewiesen werden.
Mittels „Reverser Genetik Systeme" der Viren 984 und 1082 wurden Reassortanten generiert, welche ein Gensegment des LPAI- (1082) und sieben Gensegmente des HPAI-Virus (984) tragen. Signifikante Unterschiede im Wachstum auf aviären Zellen, die auf das Vorhandensein viraler Pathogenitätsmerkmale schließen lassen, konnten nur bei einem Austausch des NS- bzw. des HA-Segments beobachtet werden.
Das HA der hochpathogenen Virusisolate wies neben einer multibasischen Spaltstelle eine zusätzliche Glykosylierung im Bereich der Rezeptorbindungsstelle auf, die in den meisten niedrigpathogenen Varianten nicht zu detektieren war. Um diese zusätzlichen Glykane näher zu charakterisieren wurden HPAI-Virusmutanten hergestellt, deren Glykosylierungsmuster an der Rezeptorbindetasche des HAs dem der LPAI-Viren entspricht. Das verringerte Wachstum dieser Mutanten, sowie deren verzögerte Ausbreitung in aviären Embryonen konnte auf molekularer Ebene auf eine ineffiziente Virusfreisetzung zurückgeführt werden.
Der Austausch des NS-Segments führte auf aviären Zellen ebenfalls zu einer verminderten Vermehrung der reassortierten Viren. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass dieses Wachstumsdefizit auf Mutationen in den zellulären Lokalisationssignalen des NS1 basiert. Das NS1-Protein der HPAI-Viren konnte akkumuliert in den Nukleoli und dem Cytoplasma der infizierten Zellen detektiert werden, während die LPAI-Variante zu großen Teilen nukleär, aber nicht ausschließlich nukleolär lokalisiert war.

4.2 Herstellung und Charakterisierung von Influenza-Reassortanten

4.2.1 Herstellung rekombinanter Viren des Stammes A/chicken/Italy/1082/99

Neben dem bereits etablierten reversen Genetik-System des HPAI-Virus 984 (A/ostrich/Italy/984/00) wurde ein System zur Herstellung von rekombinantem LPAI Virus 1082 (A/chicken/Italy/1082/99) benötigt. Hierzu wurde mit Hilfe des QIAamp® Viral RNA Mini Kit virale vRNA aus 1082 Virussuspension isoliert, um sie in der nachfolgenden Klonierung in ein RNA-Polymerase I-/ RNA-Polymerase II-Promotor Plasmid (pHW2000) einzusetzen (siehe Hoffmann et al., 2000). Zur reversen Transkription der acht vRNAs wurde entsprechend der Herstellerangaben des Omniscript RT Kits (Qiagen) vorgegangen. Als Primer diente ein 12 Basen langes Oligonukleotid, das sich an die Influenza-spezifischen 5´-Enden der vRNAs anlagern konnte. In der anschließenden PCR wurden Primer verwendet, die entsprechend der Vorgaben zur späteren Klonierung mit Hilfe des „BD In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kits“ (3.7) konzipiert waren. Nach Transformation und Plasmidisolation (3.9) wurden positive Klone (Abb. 4.1 Kontroll-PCR) gleichermaßen auf 1µg/µl zur Herstellung der Virusreassortanten eingestellt.

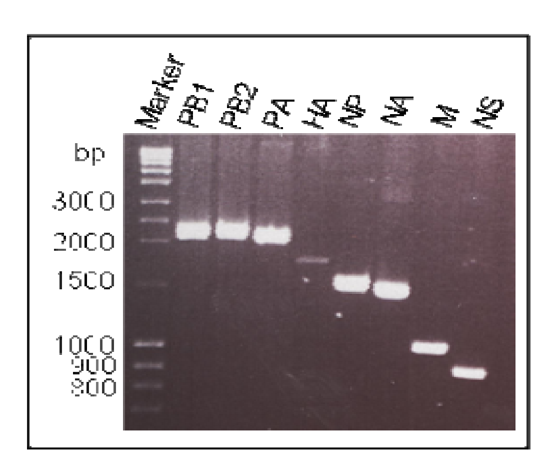


Abb. **4.1** PCR-Produkte hergestellt mit den spezifischen Klonierprimern der Influenza-Gensegmente im pHW2000-Vektor. Auftrennung in 1%igem Agarosegel.

4.2.2 Herstellung von Reassortanten

Zur Herstellung von Virusreassortanten wurden Mischkulturen, wie in 3.13 beschrieben, transfiziert und die generierten rekombinanten Viren nach Plaquereinigung (3.14) und Sequenzierung (3.15) im embryonierten Hühnerei vermehrt und anschließend der Virustiter

der Allantoisflüssigkeiten bestimmt. Folgende Virusreassortanten (in Tab. 4.1) wurden mittels der beiden reversen Genetik-Systeme für rekombinante 984 und 1082 Viren hergestellt:

Reassortante	Segmente des **LPAI 1082** im Hintergrund von HPAI 984							
984/1082 PB1	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 PB2	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 PA	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 HA	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 NP	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 NA	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 M	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS
984/1082 NS	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS

Tabelle **4.1** Reassortanten aus der Kombination der Gensegmente des niedrigpathogenen 1082-Virus und des hochpathogenen 984-Virus.

4.2.3 Wachstum der Virusreassortanten auf aviären Zellen

Um die Pathogenitätsdeterminanten der HPAI-Viren einzugrenzen, wurden primäre Hühnerembryofibroblasten (CEF) mit den hergestellten 984/1082 Virusreassortanten infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben des Überstandes entnommen.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 4x 10^{-4}der acht Einzelreassortanten infiziert und 16, 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion Proben abgenommen, um deren Plaquetiter zu bestimmen. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 4.2 graphisch dargestellt.

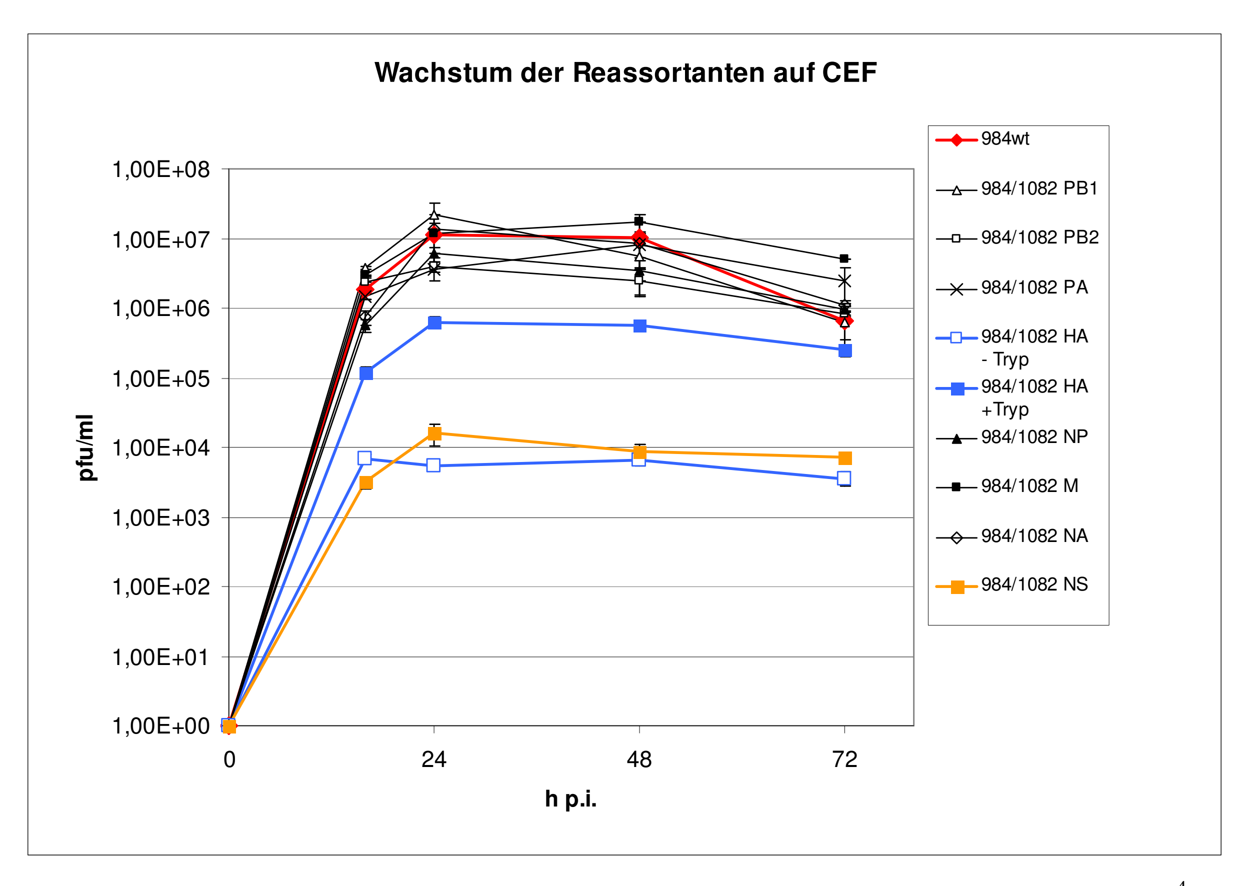


Abb. **4.2** Konfluent gewachsene Hühnerembryofibroblasten wurden mit einer MOI von $4x\ 10^{-4}$ infiziert. Der Überstand der mit den verschiedenen Reassortanten infizierten Hühnerembryofibroblasten wurde 16, 24, 48 und 72 h p.i. auf Virusmenge überprüft.

Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass der Austausch des NS- sowie des HA-Segments von 984 zu 1082 zu einem verringerten Wachstum der reassortierten Viren führt. Der Austausch des HAs ohne zusätzliche Zugabe von Trypsin (984/1082 HA –Tryp) lässt den Virustiter im Überstand der infizierten Hühnerembryofibroblasten (CEF) auf maximal $7x10^3$ pfu/ml steigen (siehe Kap. 1.10). Mit Zugabe von Trypsin (984/1082 HA +Tryp) erreicht der Titer $6,3x10^5$ pfu/ml. Der Titer des 984-Wildtyp-Virus (984wt) hingegen liegt bei ca. $1,1x10^7$ pfu/ml und ist somit um den Faktor 18 höher als der Titer der Reassortante 984/1082 HA unter Zugabe von Trypsin. Diese Differenz weist auf einen Virulenzfaktor im HA-Protein hin, der nicht durch die Entstehung der multibasischen Spaltstelle im HPAI-Virus 984wt zu erklären ist.

Eine noch deutlichere Differenz im Virustiter kann nur beobachtet werden, wenn das 1082 NS-Segment in den Hintergrund des 984-Virus eingebracht wird (984/1082 NS). Mit maximal $1,6x10^4$ pfu/ml liegt dieser ca. um das 680fache niedriger als im Überstand der mit 984wt-Virus infizierten CEF.

Der Austausch eines der anderen Segmente führt in der Wachstumskurve der entsprechenden Reassortanten (984/1082 PB1, 984/1082 PB2, 984/1082 PA, 984/1082 NP, 984/1082 NA und 984/1082 M) nicht zu einer signifikanten Veränderung im Vergleich zum 984wt-Virus.

4.2.4 Sequenzvergleich LPAI vs. HPAI Hämagglutinin

Das HA-Protein des 1082-Virus (LPAI) unterscheidet sich neben der inserierten multibasischen Spaltstelle (338-341) in weiteren acht Aminosäuren von dem des HPAI 984-Virus (siehe Tab. 4.2). Die auffälligste Veränderung ergibt sich aus dem Austausch des Alanins zu Threonin an Position 125, was zur Entstehung einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle in der Nähe der Rezeptorbindungstasche führt. Weitere LPAI-Viren der Italien-Epizootie entwickelten zudem ein zusätzliches Glykan an Aminosäureposition 149 (siehe Kap. 1.13). Diese Glykosylierungsstellen wurden im Laufe dieser Arbeit näher untersucht.

Position (H1 Numerierung)	Mutation
119	T → A
125	A → T
128	A → T
184	V → G
217	A → E
338-341	Insertion SRVR
444	A → T
457	Q → L
543	K → R

Tab. **4.2** Positionen der Mutationen, die zwischen dem HA Protein des niedrigpathogenen 1082-Virus und dem des hochpathogenen 984-Virus existieren.

4.2.5 Sequenzvergleich LPAI vs. HPAI NS1

Beim Vergleich der NS1-Proteinsequenzen des 1082- und des 984-Virus konnten zwei Mutationen im Kernexportsignal (NES) detektiert werden (Position 136 und 139). Des Weiteren war der C-Terminus des HPAI (984)-NS1 im Vergleich zum LPAI (1082)-NS1 um 6 Aminosäuren deletiert. Das NS2, obwohl vom gleichen Gensegment als Spleißvariante synthetisiert, wurde von den Mutationen nicht beeinflusst.

Position	Mutation
136	V → I
139	D → N
225-230	Deletion: RVESEV

Tab. **4.3** Positionen der Mutationen, die zwischen dem NS1 Protein des niedrigpathogenen 1082-Virus und dem des hochpathogenen 984-Virus existieren.

4.3 Herstellung rekombinanter Virusmutanten

Um die zuvor detektierten Mutationen im HA- und NS1-Protein des 984-Virus näher zu charakterisieren, wurden rekombinante Virusmutanten aus den bereits etablierten 984- und 1082-Systemen (siehe Kapitel 4.2.1) hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden polI-HA- und polI-NS-Plasmide durch *in vitro* Mutagenese (Kap. 3.8) wie folgt verändert.

4.3.1 Mutagenese der polI-HA-Plasmide

Zur Untersuchung der zusätzlichen Glykosylierungsstellen im Hämagglutinin der Virusisolate der Italienepidemie 1999/2000 (siehe Kap. 1.13) wurden bereits zuvor die entsprechenden Mutationen in die HA-Plasmide des 984-Virus eingeführt. Zuerst wurde dabei ein 984-HA-Plasmid ohne Glykosylierungsstelle an der Rezeptorbindetasche (HA-G0) hergestellt. Nach Überprüfung des HA-G0-Plasmids wurde hieraus ein weiteres Konstrukt mit nur einer Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 149 (HA-G2) generiert. Die Plasmide wurden

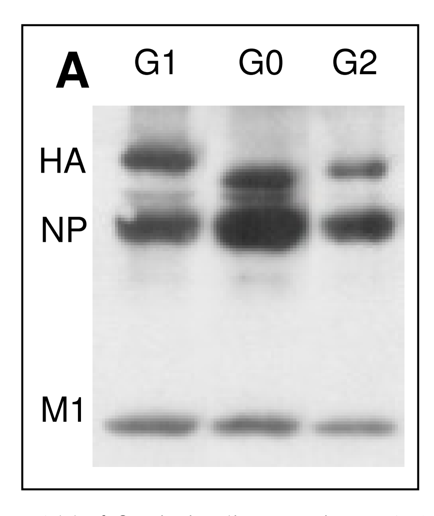
anschließend durch Sequenzierung auf die gewünschten Mutationen überprüft. Das Wildtyp 984-HA-Plasmid besitzt ein Glykan an Position 123 und wird nachfolgend als HA-G1 bezeichnet.

4.3.2 Mutagenese der polI/polII-NS-Plasmide

Die Primer für die NS1-Mutagenese des polI-NS-Plasmids des 984-Virus, beziehungsweise des polI/polII-NS-Plasmids des 1082-Virus wurden so gewählt, dass sie die Sequenz des NS2-Gens nicht beeinflussten. Das 984-NS-Plasmid wurde mit den Primern Ital-NS-IN/VD-fo und Ital-NS-IN/VD-re durch *in vitro* Mutagenese (Kap. 3.8) so verändert, dass das NS1 des LP/HP-Plasmids das Kernexportsignal (NES) des LPAI-Virus 1082 (Position: 136 V, 139 D) aufweist. Umgekehrt wurde bei der Mutagenese des 1082-NS-Plasmids vorgegangen. Bei dem HP/LP-Plasmid wurde mit Hilfe der Primer Ital-NS-VD/IN-fo und Ital-NS-VD/IN-re das NES des HPAI-Virus 984 eingefügt (Position: 136 I, 139 N).

4.3.3 Rescue der Virusmutanten

Mittels reverser Genetik sollten rekombinante 984-Viren hergestellt werden, die sich ausschließlich in den mutierten Positionen von HA und NS1 unterscheiden. Dazu wurden 293T-Zellen mit den polI-Plasmiden des 984-Virus und den entsprechenden HA-Plasmiden (HA-G0, HA-G1, HA-G2) oder NS-Plasmiden (NS-LP/LP, NS-LP/HP, NS-HP/LP, NS-HP/HP) transfiziert. Der Rescue erfolgte wie unter 3.13 beschrieben. Das Genom der erzeugten Viren wurde sequenziert und zusätzlich das Vorhandensein der HA-Glykosylierungen sowie die Deletion des NS1-Proteins durch Western Blot-Analysen (siehe Abb. 4.3) überprüft.



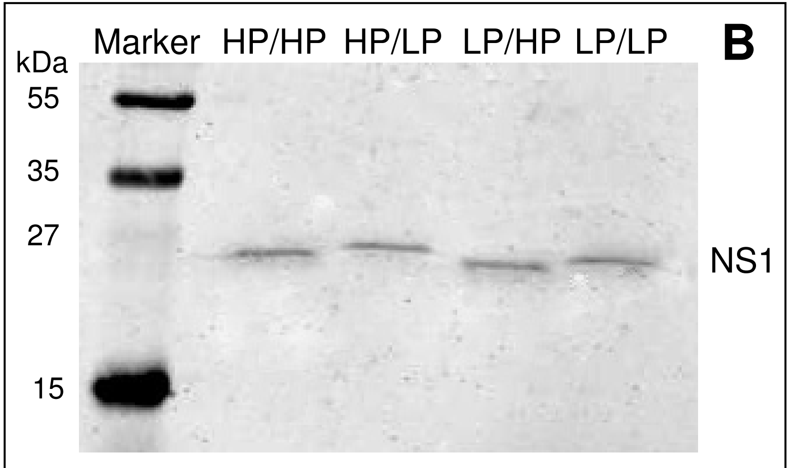


Abb **4.3** Die in die Proteine HA (A) und NS1 (B) eingebrachten Mutationen wurden mittels Western Blot überprüft. MDCK II-Zellen wurden mit einer MOI von 2 infiziert und 10h p.i. lysiert. Das Lysat wurde in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt, und das HA-Protein mit Anti-KP-Serum (Kaninchen) sowie das NS1-Protein mit Anti-NS1-Antikörper (Ziege) detektiert. Zur Visualisierung im Odyssey-Scanner (LICOR) wurden Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper verwendet. Die zusätzliche Glykosylierung des HAs sowie der verlängerte C-Terminus des NS1 führte zu einem Shift im Laufverhalten im SDS-Gel. Das HA-Protein ist als Einzelbande zu sehen, da kein Mercaptoethanol zur Auflösung der Disulfidbrücke zwischen HA_1 und HA_2 zugegeben wurde.

Es konnten alle eingeführten Mutationen in den entsprechenden Segmenten verifiziert und unerwünschte Mutationen in den restlichen Segmenten ausgeschlossen werden. Die rekombinanten Viren sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

Genom-Segment	Virusmutante						
	984 G0	984 G1	984 G2	984 HP/HP	984 LP/HP	984 HP/LP	984 LP/LP
PB1	984	984	984	984	984	984	984
PB2	984	984	984	984	984	984	984
PA	984	984	984	984	984	984	984
HA	HA-G0	HA-G1	HA-G2	984	984	984	984
NP	984	984	984	984	984	984	984
NA	984	984	984	984	984	984	984
M	984	984	984	984	984	984	984
NS	984	984	984	NS HP/HP	NS LP/HP	NS HP/LP	NS-LP/LP

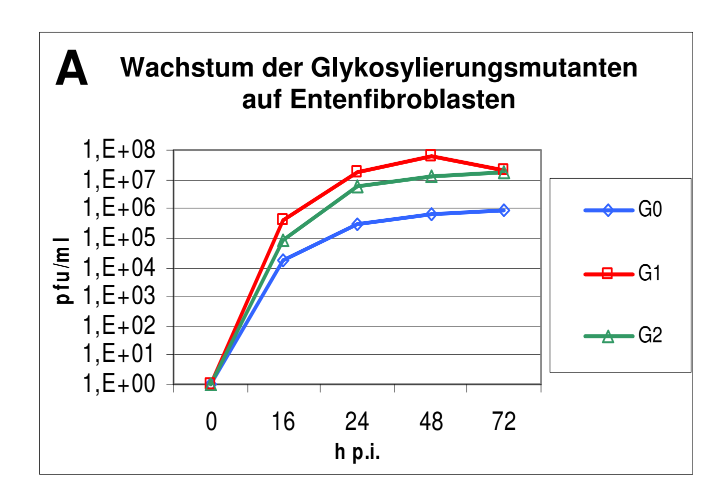
Tab. **4.4** Hergestellte 984-Virusmutanten die sich ausschließlich in den eingebrachten Mutationen im HA oder NS1-Gen unterscheiden.

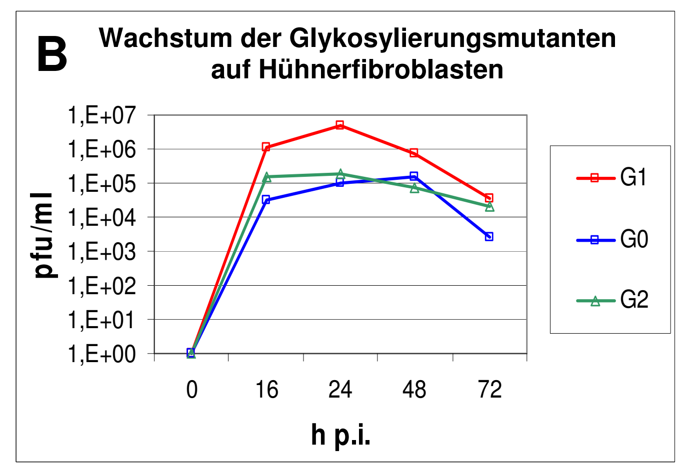
4.4 Charakterisierung der HA-Glykosylierungsmutanten

4.4.1 Wachstum auf verschiedenen aviären Zellen

Influenza A-Viren des Subtyps H7N1 konnten während des Ausbruchs in Nord-Italien (siehe Kap. 1.13) aus verschiedenen aviären Spezies isoliert werden. Diese Viren entwickelten in den verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägte Krankheitsverläufe, die von milden, kaum detektierbaren Beschwerden bis hin zu einer tödlich verlaufenden Infektion reichten. Um zu evaluieren, ob es sich bei den entstandenen zusätzlichen Glykosylierungen des HAs um Anpassungen an einzelne aviäre Spezies handelt, wurden CEF, DEF und TEF-Zellen mit einer MOI von 0,0004 der Glykosylierungsmutanten 984-G0, -G1 und -G2 infiziert und eine Wachstumskurve erstellt. Dazu wurde 16, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion Überstand des Mediums entnommen. Um zu bestimmen, ob in diesen Zeitintervallen eine Virusvermehrung stattgefunden hat, wurde mittels Plaquetest der Titer des Überstandes zum entsprechenden Zeitpunkt ermittelt. Die erhaltenen Daten sind in den Abb. 4.4 A-C graphisch dargestellt.

Hieraus ist ersichtlich, dass sich die drei Glykosylierungsmutanten hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz auf CEF, DEF und TEF deutlich voneinander unterscheiden. Die G0-Mutante wächst in allen getesteten aviären Zellen zu den geringsten Titern heran. Das G1-Virus zeigt die höchste Wachstumsgeschwindigkeit mit maximalen Titern von etwa $6x10^6$ pfu/ml in CEF, $7x10^7$ pfu/ml in TEF und $8x10^5$ pfu/ml in DEF. Die maximalen Titer dieses Virus sind im Vergleich zum G0-Virus in allen Zellen um etwa das 100fache erhöht. Die Titer des G2-Virus sind in CEF im Vergleich zum G0-Virus nur geringfügig höher, liegen jedoch in DEF bereits etwa eine log-Stufe höher. Eine Ausnahme bildet die G2-Mutante auf TEF, die mit maximal $1,6x10^7$ pfu/ml annähernd die Titer des G1-Virus erreicht. Generell lässt sich sagen, dass die zusätzliche Glykosylierung an Aminosäure-Position 123 im HA (G1-Virus) zu einer Beschleunigung und Steigerung der Virusproduktion führt. Die Glykosylierungsstelle an Position 149 des HAs (G2-Virus) verstärkt das Viruswachstum nur teilweise im Vergleich zur Mutante ohne zusätzliches Glykan in der Nähe der Rezeptorbindungstasche (G0-Virus).





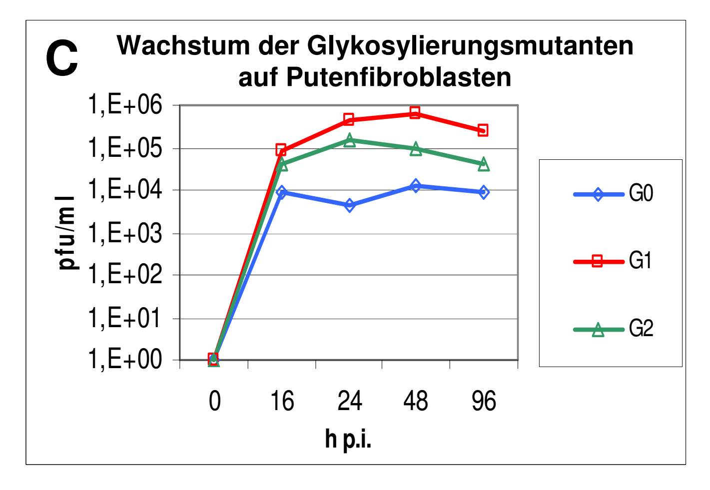


Abb. **4.4** Wachstum der Glykosylierungsmutanten G0, G1 und G2 in Puten- (A), Hühner- (B) und Entenzellen (C). Die Embryofibroblasten wurden mit einer MOI von $4x10^{-4}$ infiziert. Der Überstand der infizierten Zellen wurde 16h, 24h, 48h und 72 h p.i. auf die vorhandeneVirusmenge überprüft.

4.4.2 Gewebstropismus in verschiedenen aviären Embryonen

Die mit G0-, G1- und G2-Virus infizierten Embryonen der Art *Gallus gallus* (Haushuhn), *Meleagris gallopavo* (Truthahn/Pute) und *Anas platyrhynchos* (Stockente) wurden zur Untersuchung des Gewebstropismus sagital in 20µm dünne Scheiben geschnitten, um anschließend mittels *in situ* Hybridisierung (Abb. 4.5 Huhn G0-G2) und immun-histochemischer Nachweismethoden (Abb. 4.5 Ente und Pute G0-G2) (siehe Kap. 3.17-20)

Bereiche zu detektieren, in denen Virusreplikation stattfindet. Während bei der Methode der *in situ* Hybridisierung die virale RNA in infizierten Zellen detektiert wird, können durch immunhistochemische Anfärbung virale Proteine in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Da jedoch bei beiden Methoden spezifisch infizierte Zellen angefärbt werden, können die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Infizierte Zellen erscheinen bei der *in situ* Hybridisierung schwarz angefärbt. Beim immunhistochemischen Virusnachweis wurde im Überblick des gesamten Torsos der infizierten Embryonen (Abb. 4.5) ein 800nm-Fluoreszenz-markierter Zweitantikörper verwendet, der beim Scannen der Schnitte im Odyssey-Gerät (LICOR) grün abgebildet wird. Durch die Färbung der Schnitte mit Hilfe von HRP-gekoppeltem Zweitantikörper und DAB-Behandlung erscheinen die detektierten Virusproteine im Mikroskop dunkelbraun.

Auffällig ist, dass sich das G1-Virus in allen untersuchten Spezies systemisch ausbreiten kann. Während die von der G2-Mutante infizierten Bereiche sich in Enten- und Putenembryonen nur geringfügig von denen des G1-Virus unterscheiden, lässt sich im Hühnerembryo ein ausgeprägter Herztropismus erkennen. Das G0-Virus zeigt in allen drei Spezies die geringste Ausbreitungsgeschwindigkeit. Im Huhn ist es hauptsächlich im Herzen nachzuweisen, kann jedoch punktuell auch in anderen Bereichen detektiert werden. Im Putenembryo zeigt sich ebenfalls eine sehr punktuelle Verteilung der Infektion, während im Entenembryo hauptsächlich Bereiche des Magen-Darm-Traktes betroffen sind.

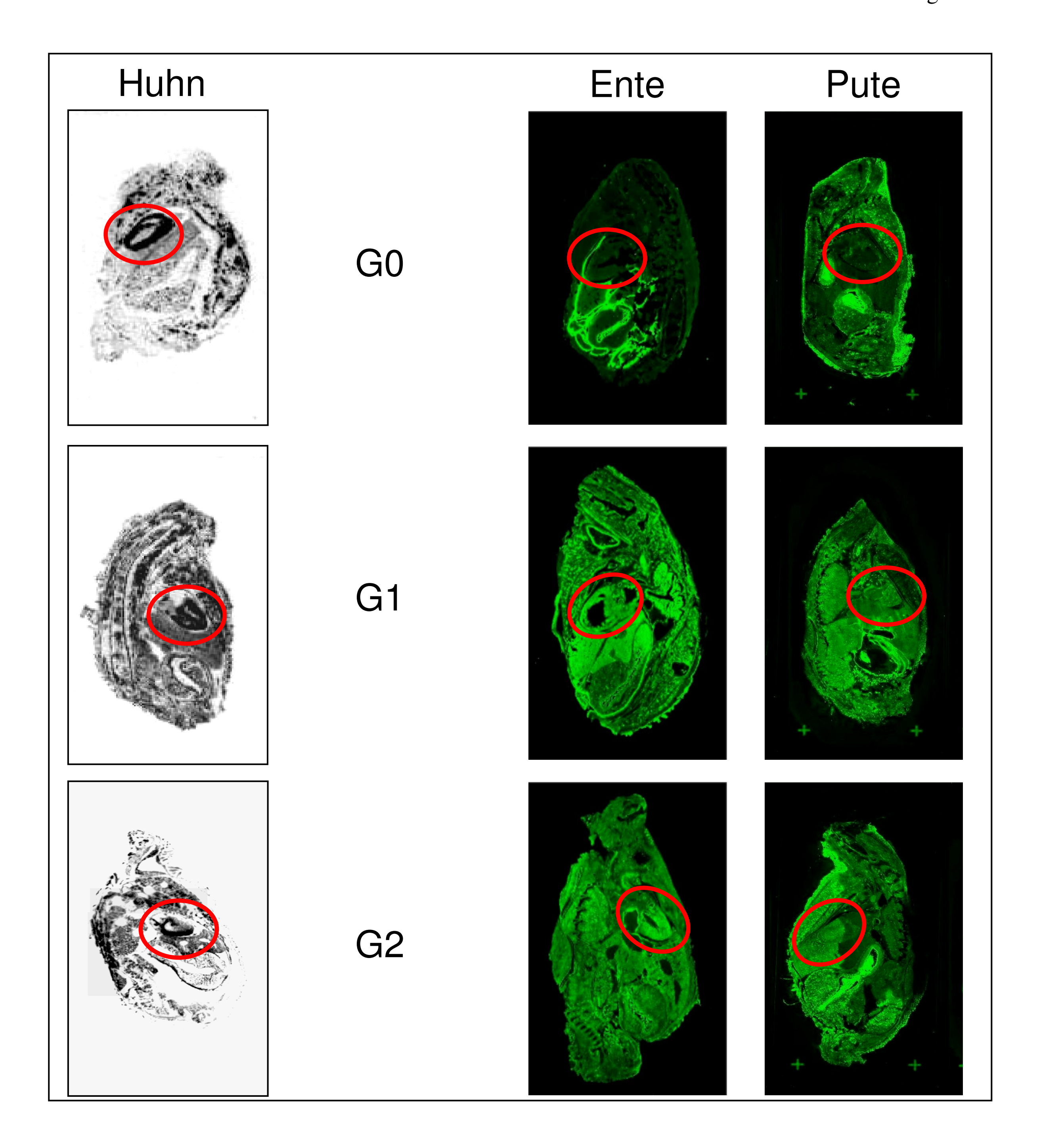


Abb. **4.5** Gewebstropismus der Viren G0, G1 und G2 in infizierten Hühner-, Puten- und Entenembryonen. Die 11-13 Tage alten Embryonen wurden mit je 1000 pfu infiziert, 36h p.i. in -50°C-kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend 20µm breite sagitale Schnitte angefertigt. Links*:* *in situ* Hybridisierung mit ^{35}S-markierten RNA-Sonden gegen influenza NP-mRNA (schwarz). Rechts: Immunhistochemischer Virusnachweis (grün) im Odyssey-Scanner mit Anti-KP-Serum (Kaninchen) und Anti-Kaninchen-800nm-Antikörper. Im rot umrandeten Bereich befindet sich das Herz.

Die Schnitte der Embryonen wurden anschließend einer Hämatoxylin-Eosin Behandlung unterzogen und im Fall der immunhistochemischen Anfärbung wurde Virusprotein mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper und DAB-Behandlung nachgewiesen. Radioaktiv markierte virale mRNA wurde durch Überschichtung mit Foto-Emulsion detektiert.
Im Hühnerembryo zeigt sich (siehe Abb. 4.6), dass bei der Infektion mit dem G1-Virus besonders das Endothel betroffen ist. Dies ist deutlich in den großen Blutgefäßen (Abb. 4.6 C *), den Blutgefäßen der Lunge (Abb. 4.6 K *) und dem Endokard des Herzens (Abb. 4.6 G **o**) zu beobachten. Die sich entwickelnden Blutgefäße in der aviären Lunge gruppieren sich hier um die zentral liegenden Parabronchien. Wie in Abb. 4.6 F, G und H # zu erkennen ist, können Myozyten des Herzens durch alle Glykosylierungsmutanten infiziert werden. Wie aus Abb. 4.6 B und C hervorgeht, sind das G2-Virus und insbesondere das G0-Virus jedoch in ihrer Fähigkeit, das Endothel (hier die *Tunica intima*) zu infizieren, enorm eingeschränkt.

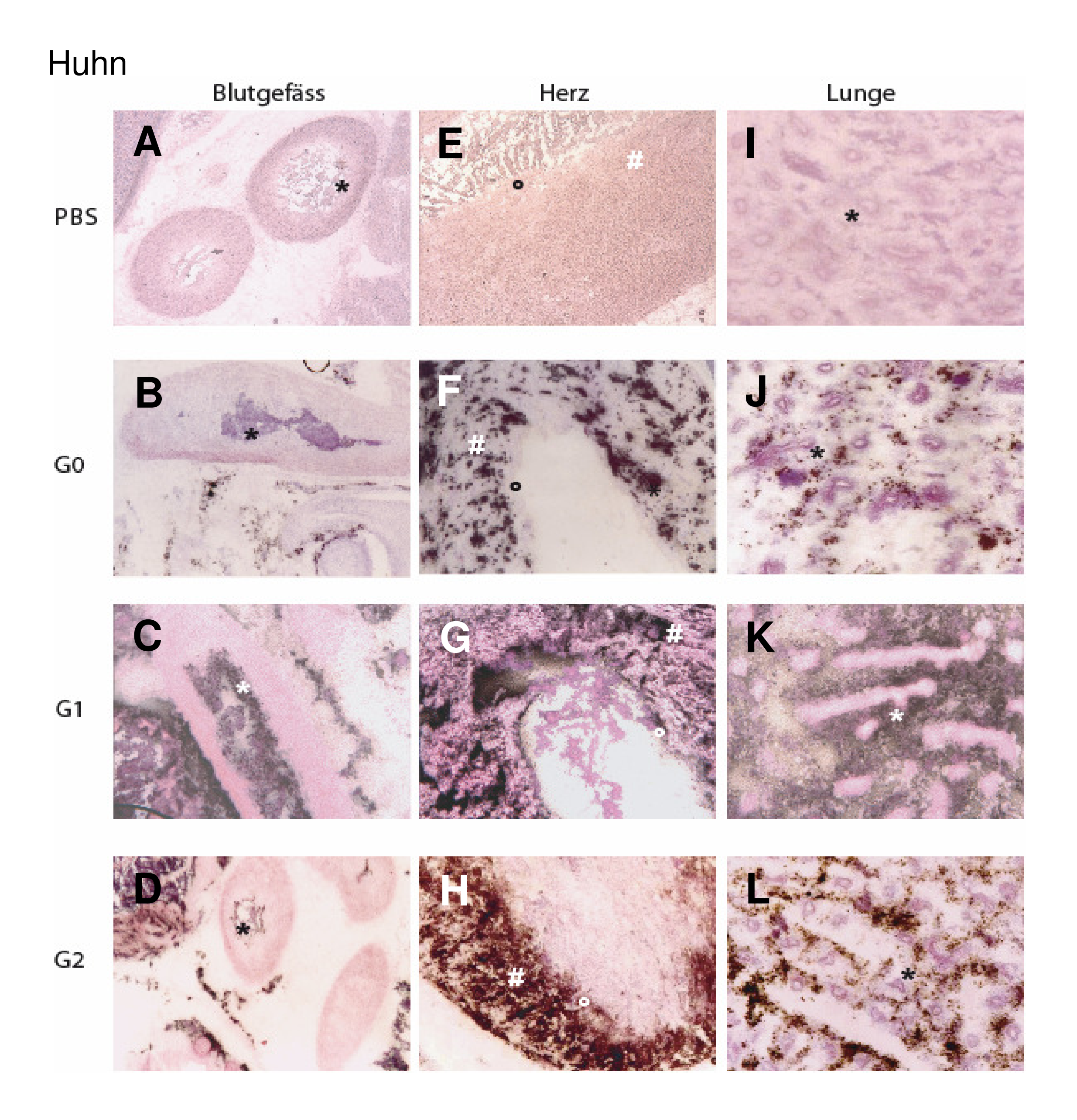


Abb. **4.6** Zelltropismus der Glykosylierungsmutanten in Hühnerembryonen. Die 11 Tage alten Embryonen wurden mit je 1000 pfu infiziert, 36h p.i. in -50°C-kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend wurden 20µm breite sagitale Schnitte angefertigt. Mittels *in situ* Hybridisierung einer ^{35}S-markierten RNA-Sonde gegen die virale NP-mRNA wurde Virus (schwarz) in den Embryonenschnitten nachgewiesen und anschließend HE gegengefärbt. Die Bilder zeigen in 63facher Vergrößerung große Blutgefäße (A-D) und Herz (E-H, sowie Lunge (I-L) der Embryonen in 180facher Vergrößerung. # = Myozyten. o = Endokard. * = Endothel.

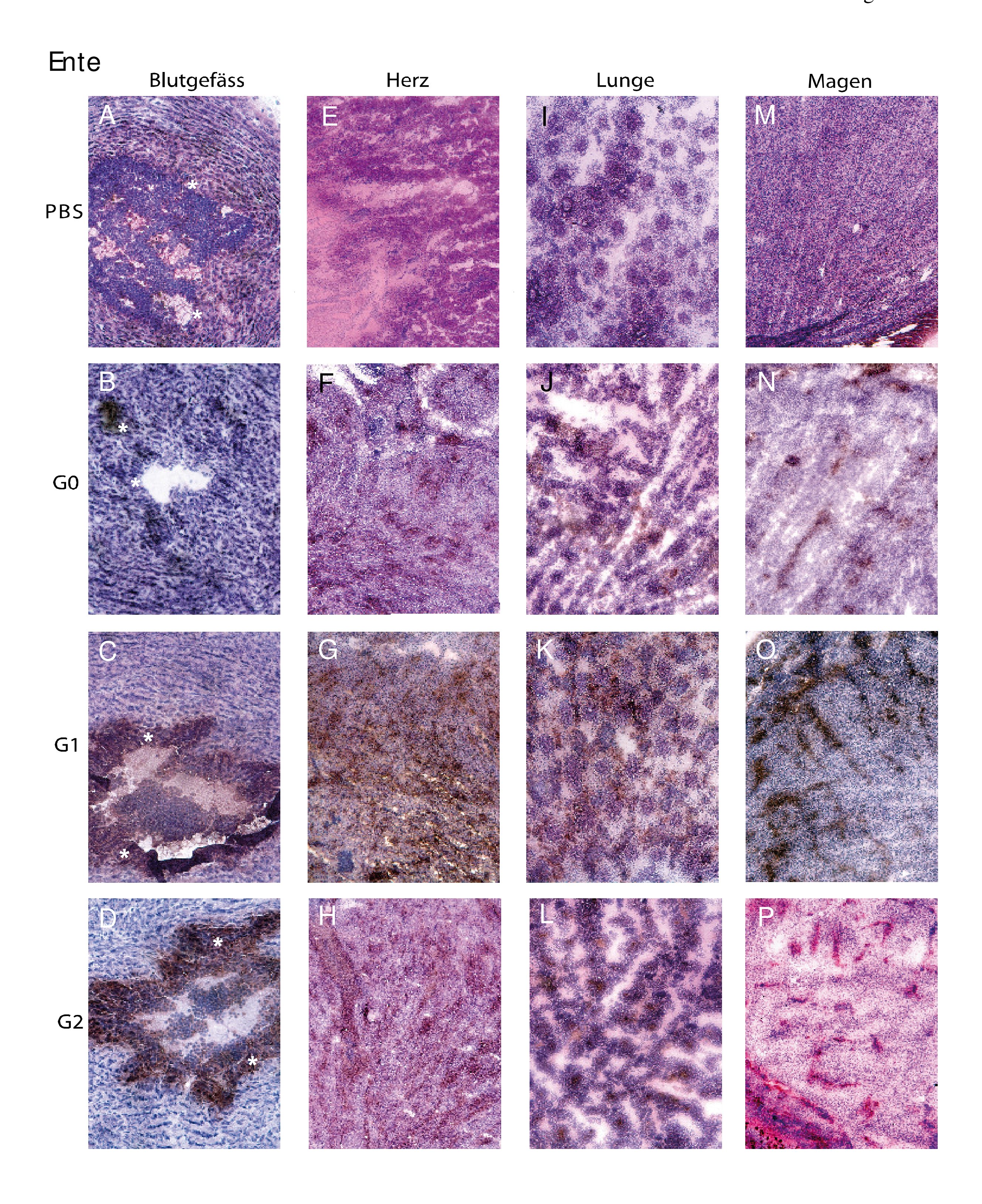


Abb. **4.7** Zelltropismus der Glykosylierungsmutanten in Entenembryonen. Die 13 Tage alten Embryonen wurden mit je 1000 pfu infiziert, 36h p.i. in -50°C-kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend wurden 20µm breite sagitale Schnitte angefertigt. Immunhistochemischer Virusnachweis (dunkelbraun) mit Anti-KP-Serum (Kaninchen), Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper und DAB-Anfärbung. Die Schnitte wurden anschließend HE gegen gefärbt. Die Bilder zeigen in 400facher Vergrößerung große Blutgefäße (A-D) sowie Herz (E-H), Lunge (I-L) und Magen (M-P) der Embryonen in 63facher Vergrößerung. * = Endothel.

In den Schnitten der infizierten Entenembryonen ist zu erkennen, dass sich das G1- und das G2-Virus in annähernd gleichem Ausmaß in den Endothelzellschichten der großen Blutgefäße vermehrt (Abb. 4.7 C und D). Das G0-Virus hingegen kann dort wie bereits zuvor in den infizierten Hühnerembryonen kaum nachgewiesen werden (Abb. 4.7 B). Auch im Herz kann die G0-Mutante nur schwach detektiert werden (Abb. 4.7 F), während das Herz der mit G1- und G2-Virus infizierten Embryonen stark braun angefärbt ist (Abb. 4.7 G und H).
Auch in den Endothelien der Lunge (siehe 4.7 J-L) und des Magens ist die Replikation der G0-Mutante im Vergleich zum G1- und G2-Virus stark verringert. Während die braune Anfärbung der Virusproteine entlang der Gefäße in der Magenwand beim G1- und dem G2-Virus in Abb. 4.7 O und P deutlich zu erkennen ist, handelt es sich bei der G0-Mutante (4.7 N) nur um eine punktuelle, lokal begrenzte Infektion.
Die Virusausbreitung im Putenembryo weicht nur geringfügig von der im Entenembryo ab (Abb. 4.8). Jedoch lässt sich hier eine deutlichere Infektion der Endothelien, besonders in den großen Blutgefäße, durch das G0-Virus nachweisen (Abb. 4.7 B).

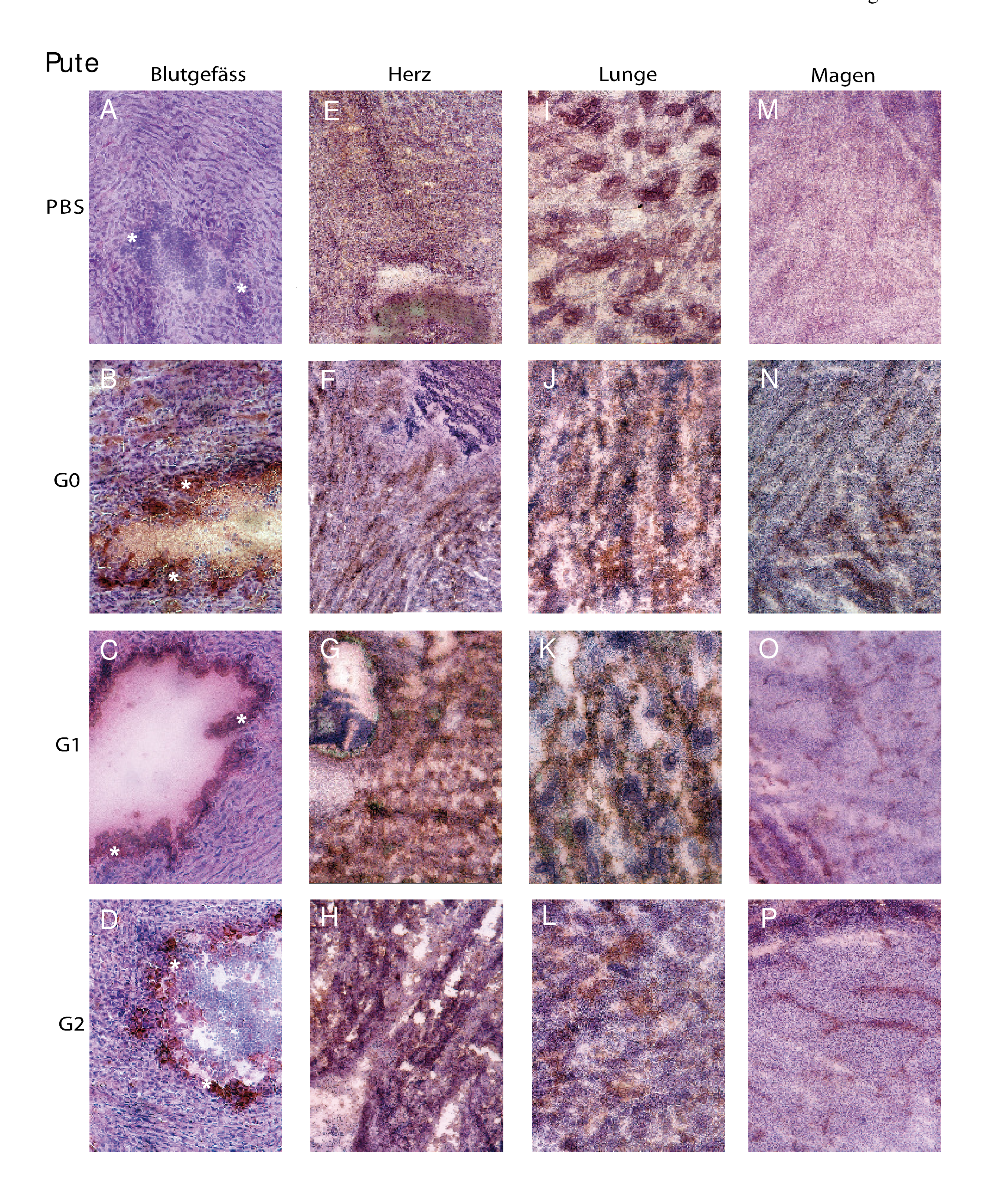


Abb. **4.8** Zelltropismus der Glykosylierungsmutanten in Putenembryonen. Die 11 Tage alten Embryonen wurden mit je 1000 pfu infiziert, 36h p.i. in -50°C-kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend wurden 20µm breite sagitale Schnitte angefertigt. Immunhistochemischer Virusnachweis (dunkelbraun) mit Anti-KP-Serum (Kaninchen), Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper und DAB-Anfärbung. Die Schnitte wurden anschließend HE gegen gefärbt. Die Bilder zeigen in 400facher Vergrößerung große Blutgefäße (A-D) sowie Herz (E-H), Lunge (I-L) und Magen (M-P) der Embryonen in 63facher Vergrößerung. * = Endothel.

4.4.3 Mittlere Todeszeit infizierter Embryonen

Um Unterschiede in der Pathogenität der Viren für den aviären Wirt zu ermitteln, wurden die mittleren Todeszeiten (Mean death time, MDT) infizierter Hühnerembryonen, wie in Kap. 3.21 beschrieben, bestimmt. Infiziert wurde mit einer Dosis, die ausreichend ist, um 100% der Embryonen zu infizieren.

Die G0-Mutante zeigt in Abb. 4.9 die geringste Pathogenität mit einer MDT von 86h p.i., während die G1-Variante nur knapp 30h benötigt, um alle Embryonen zu töten. Das G2-Virus zeigt einen intermediären Phänotyp mit einer MDT von fast 70h. Die beschleunigte systemische Ausbreitung der Viren mit zusätzlichem Glykan an Position 123 (in geringerem Maß auch Viren mit Glykan an Position 149) führt zu einer drastischen Verkürzung der MDT der infizierten Hühnerembryonen. Die Elimination jeglicher Glykosylierung an der Rezeptorbindungsstelle des HAs bewirkt eine Verlangsamung der Virusausbreitung, woraus im weiteren Verlauf der Infektion ein späterer Todeszeitpunkt resultiert.

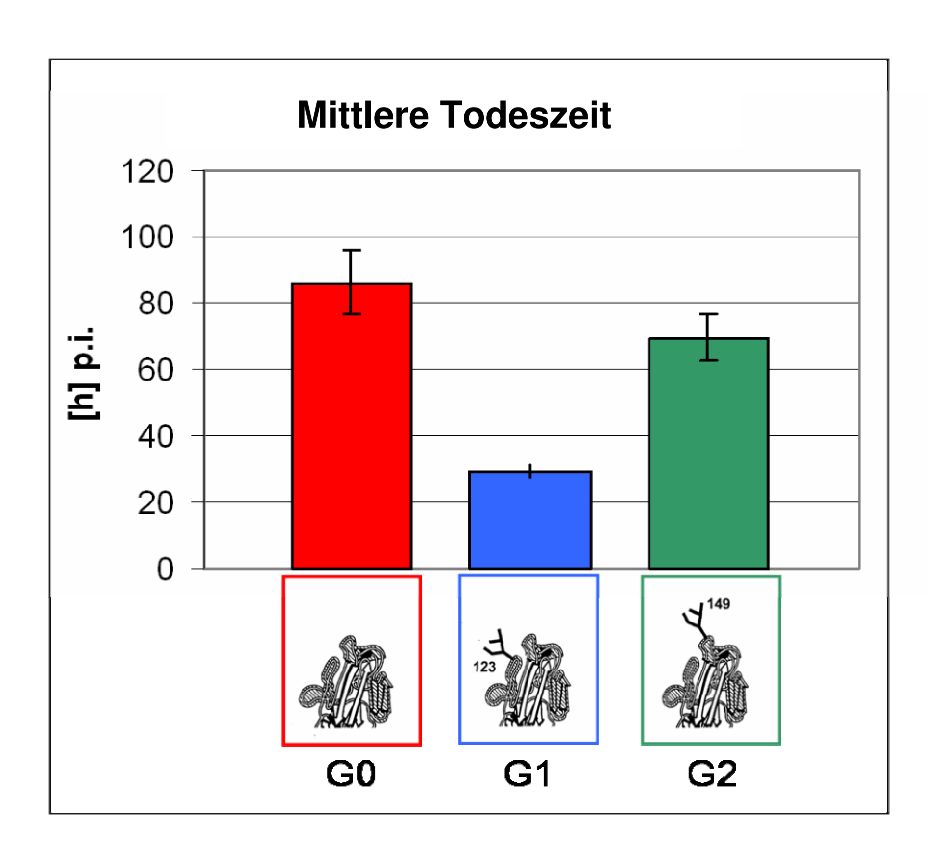


Abb. **4.9** Mittlere Todeszeit infizierter Hühnerembryonen. Pro Virus wurden jeweils 10 embryonierte Eier mit 10 pfu der Viren G0, G1 und G2 über die Allantoishöhle infiziert. Anschließend wurden die Eier alle 12h auf abgestorbene Embryonen untersucht. Die MDT drückt den mittleren Todeszeitpunkt der infizierten Embryonen aus.

4.4.4 Untersuchung der Rezeptorspezifität des Hämagglutinins

Influenza A-Viren sind in der Lage spezifisch α2-3 oder α2-6 gebundene, endständige Neuraminsäuren (NeuS) zu binden, um mittels Endozytose in ihre Zielzellen aufgenommen zu werden. Um die Bindungseigenschaften der Glykosylierungsmutanten zu charakterisieren, wurde ein Fetuinbindungstest (Fetuin binding assay) etabliert, in dem Fetuin, welches ein polyvalentes Substrat mit α2-3 oder α2-6 gebundenen, endständigen Neuraminsäuren darstellt, als Rezeptor dient. 96-Well-Platten wurden dazu mit Fetuin überschichtet, die Glykosylierungsmutanten in abnehmender Konzentration zugegeben und nach mehrmaligem Waschen wurden nicht-Virus-gebundene NeuS mittels Lektinen detektiert, die spezifisch je eine der beiden Neuraminsäureverknüpfungen erkennen (siehe Kap 3.24).

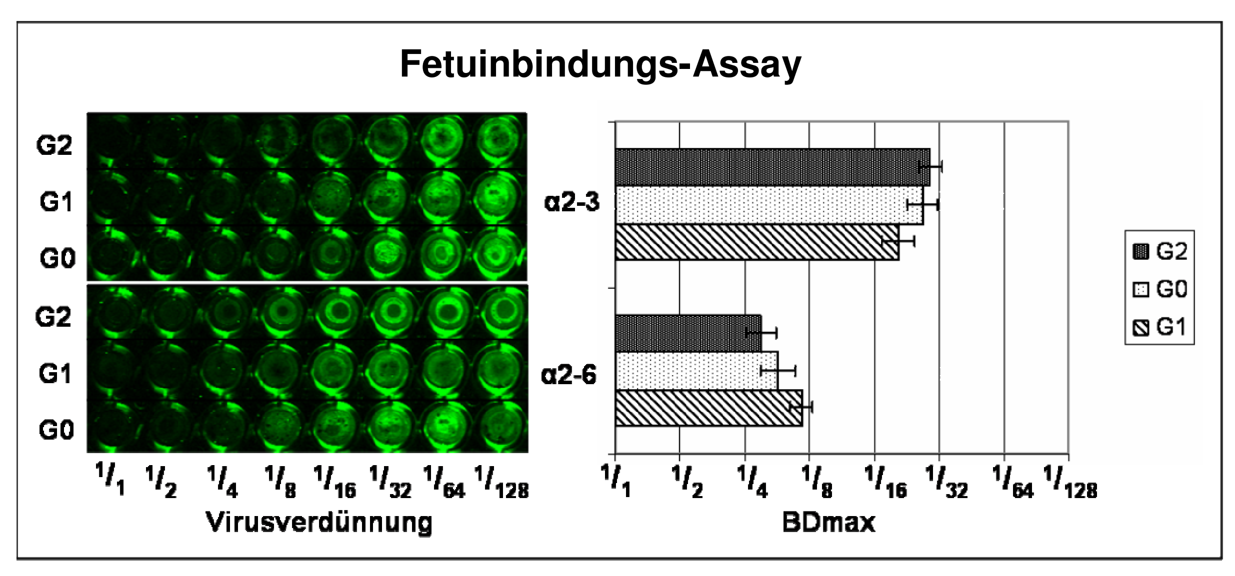


Abb. **4.10** Fetuinbindungstest der Viren G0, G1 und G2. Links: α2-6 und α2-3 verlinkte Neuraminsäuren wurden durch biotinylierte Sambucus nigra and Maackia amurensis Lektine und Fluoreszenz-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Rechts: die maximale Bindungsverdünnung (BDmax) entspricht der Verdünnungsstufe der Viren, bei der mindestens 95% der Neuraminsäuren durch das HA gebunden werden. Messungen wurden mit dem LI-COR Odyssey Infrared Imaging System durchgeführt.

Aus Abbildung 4.10 wird deutlich, dass zwischen den Glykosylierungsmutanten G1, G2 und G0 bezüglich der Präferenz der Bindung von α2-3 oder α2-6 verlinkten NeuS keine signifikanten Unterschiede bestehen. Die maximale Bindungsverdünnung (BDmax) der Viren zeigt, dass G2 nur unwesentlich besser als G0 oder G1 an α2-6 verknüpfte NeuS binden kann. Die Unterschiede in der BDmax für α2-3 verknüpfte NeuS sind noch geringer. Die in Kap 4.4.2 beschriebene Reduzierung des Endotheltropismus des G0- und G2-Virus

kann nicht durch eine geänderte Bevorzugung von α2-3 oder α2-6 verlinkten Neuraminsäuren als Rezeptormolekül der Viren erklärt werden.

4.4.5 Freisetzung neu gebildeter Viren

Ein weiterer wichtiger Schritt im Vermehrungszyklus stellt die Freisetzung der Viren nach Infektion der Zelle dar. Ist die Bindung des HA-Proteins zum zellulären Rezeptor zu stark, kann es dazu kommen, dass neu gebildete Viruspartikel an der bereits infizierten Zelle hängen bleiben und dementsprechend nicht mehr in der Lage sind, neue Zellen zu infizieren.

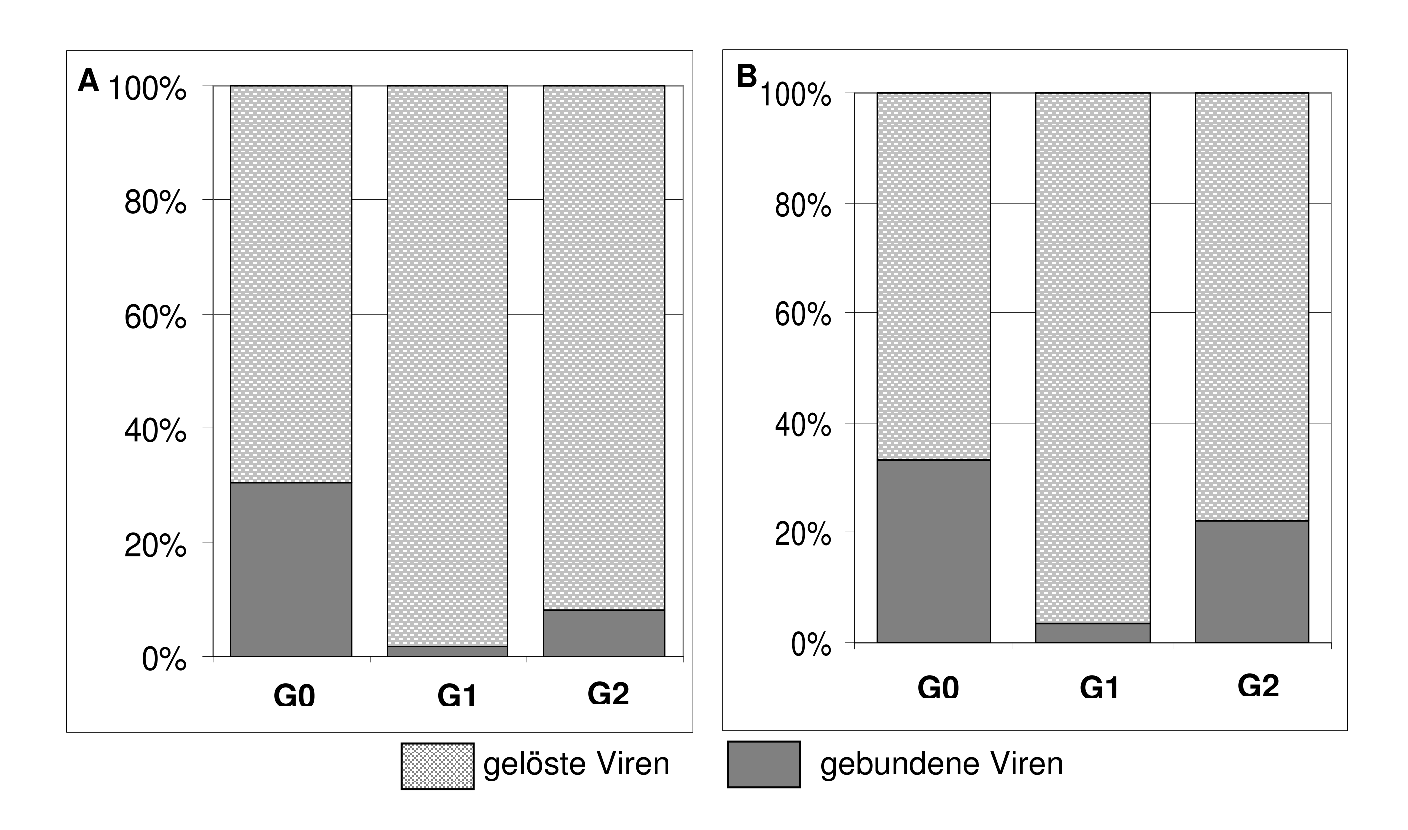


Abb. **4.11** Freisetzung der Viren G0, G1 und G2 von infizierten Hühner- (A) und Putenembryofibroblastenzellen (B). Die Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert. 24h p.i. wurden Zellen und Zellüberstand zur Freisetzung gebundener Viruspartikel getrennt voneinander mit Ultraschall behandelt. Das Verhältnis gelöster infektiöser Virionen im Zellüberstand und den an Zellen gebundenen Viruspartikeln wurde mittels Plaquetest bestimmt.

Um festzustellen, ob die in Kap 4.4.2 nachgewiesene, verringerte Ausbreitung der G2- und insbesondere der G0-Viren in aviären Embryonen durch eine Veränderung der

Virusfreisetzung zu erklären ist, wurden Hühner- (Abb 4.11 A) und Entenembryofibroblasten (Abb. 4.11 B) mit den entsprechenden Virusmutanten infiziert und 24h p.i. auf die Menge freier und gebundener infektiöser Partikel überprüft (siehe Kap 3.25).
Hier konnte beobachtet werden (Abb. 4.11 A/B), dass sich das G1-Virus am effizientesten von Zellen beider Spezies lösen kann (98,4% bzw. 96,8%), während nur 1,4% bzw. 3,2% der Viren an den Zellen haften bleibt. Dahingegen kommt es bei der G0-Mutante zu einer deutlich geringeren Freisetzung von nur 68,5% bzw. 66% der neu gebildeten Viruspartikel. Mehr als 30% der Viren bleiben an der bereits infizierten Zelle gebunden und können dementsprechend keine neuen Zellen infizieren. 8,2% bzw. 21,8% der G2-Mutante bleiben an den Zellen gebunden.

4.5 Charakterisierung der NS1-Mutanten

Wie aus Abbildung 4.2 bereits deutlich zu erkennen ist, führt das Einbringen des niedrigpathogenen NS-Gensegments in den Hintergrund des hochpathogenen Virus 984 zu einer starken Verringerung im Wachstum der reassortierten Viren. Die Unterschiede zwischen hoch- und niedrigpathogenem NS-Segment beschränken sich auf den Austausch von zwei Aminosäuren im NES und der Deletion des C-Terminus des NS1-Proteins (siehe Kap 4.2.5). Aus diesem Grund wurden die in 4.3.3 beschriebenen rekombinanten Viren hergestellt und in den hier folgenden Kapiteln charakterisiert.

4.5.1 Wachstum auf aviären Zellen

Das rekombinante 984 wt-Virus zeigt im Wachstum auf Hühnerembryofibroblastenzellen (vgl. 4.4.1) einen deutlichen Replikationsvorteil gegenüber allen getesteten Virusmutanten. Dieser Unterschied beträgt bereits 16h nach Infektion (p.i.) mehr als 2 Log-Stufen. Das Virus mit NES und C-Terminus des niedrigpathogenen NS1-Gens (984 LP/LP) zeigt ein deutlich vermindertes Wachstum zu allen untersuchten Zeitpunkten.
Die Virusmutanten 984 LP/HP und 984 HP/LP mit entweder dem NES oder dem C-Terminus der niedrigpathogenen Isolate zeigen im Wachstum einen intermediären Phänotyp der sich im Titer 16h p.i. noch nicht von der 984 LP/LP Mutante abhebt. 48h p.i. erreichen 984 LP/HP und 984 HP/LP jedoch teilweise 50fach höhere Titer. 984 LP/LP erreicht zu den späteren Zeitpunkten nur Virustiter, die 10^4 pfu/ml nicht überschreiten (siehe Abb. 4.13).

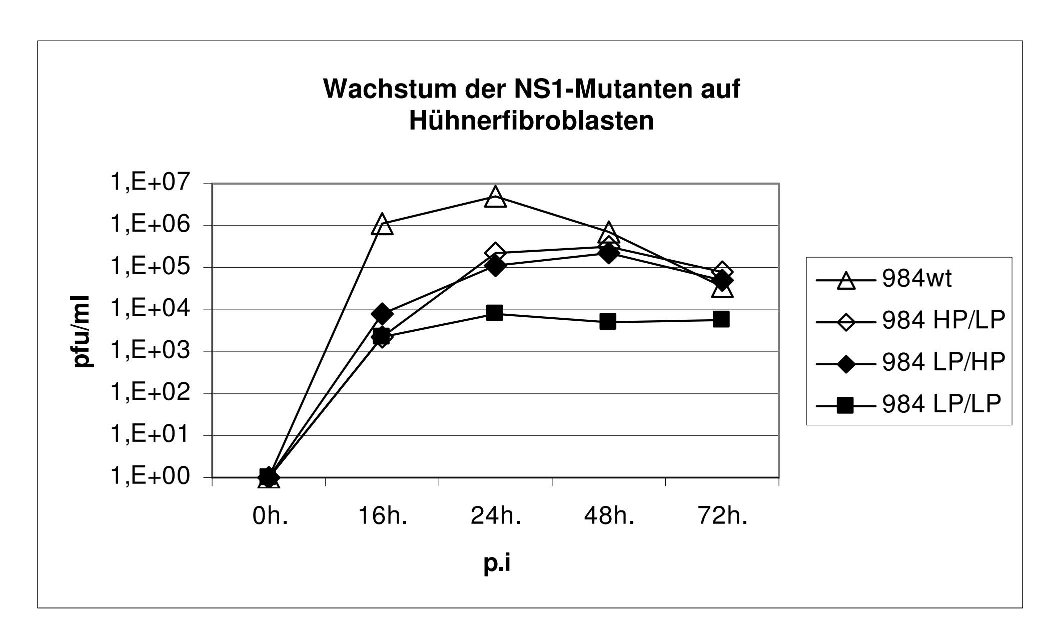


Abb. **4.13** Wachstum der NS1-Mutanten 984wt, HP/LP, LP/HP, LP/LP in Hühnerzellen. Die Embryofibroblasten wurden mit einer MOI von $4x10^{-4}$ infiziert. Der Überstand der infizierten Zellen wurde 16h, 24h, 48h und 72 h p.i. auf die vorhandene Virusmenge überprüft.

4.5.2 Mittlere Todeszeit infizierter Embryonen

Als Maß der Pathogenität drückt die Mean Death Time (MDT) den mittleren Todeszeitpunkt 11 Tage alter infizierter Hühnerembryonen bei einer bestimmt Infektionsdosis aus (vgl. Kap. 3.21). Wie aus dem Diagramm Abbildung 4.14 ersichtlich, führt die Infektion mit wt-Virus zur schnellsten mittleren Todeszeit. 984 LP/HP und 984 HP/LP zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede. Die infizierten Hühnerembryonen überleben etwa 8 h länger als bei 984 wt. Die Variante 984 LP/LP zeigt die geringste Pathogenität und die entsprechend höchste MDT, die mit 49,2 h etwa 12 h über der des 984 wt Virus liegt.

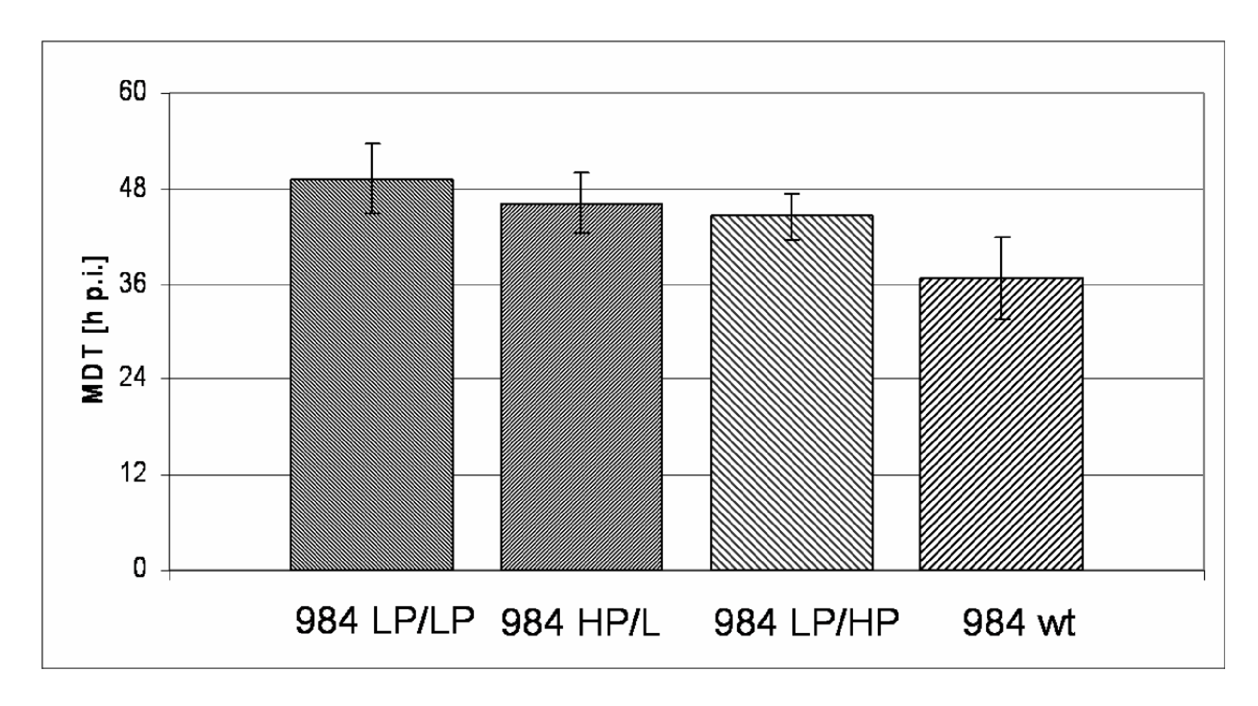


Abb.**4.14** Mittlere Todeszeit infizierter Hühnerembryonen. Es wurden jeweils 10 embryonierte Eier mit 10 pfu der Viren 984 LP/LP, HP/LP, LP/HP und 984wt über die Allantoishöhle infiziert. Anschließend wurden die Eier alle 12h auf abgestorbene Embryonen untersucht. Die MDT drückt den mittleren Todeszeitpunkt der infizierten Embryonen aus.

4.5.3 Infektiosität der NS1-Virusmutanten

Zur Bestimmung der EID50 (Infektionsdosis, die notwendig ist, um die Hälfte der inokulierterten Hühnereier zu infizieren) wurden Eier mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Virusmutanten infiziert (siehe Kap. 3.21). Wie aus Abbildung 4.15 hervorgeht, benötigt das rekombinante Virus 984 LP/LP eine Infektionsdosis von etwa 6,6 pfu zur Infektion der Hälfte der Eier. 984 HP/LP und 984 LP/HP benötigen Infektionsdosen von 1,2 bzw. 1,4 pfu. Das rekombinante Wildtypvirus 984 wt weist mit ca. 0,5 pfu deutlich die geringste EID_{50} auf. Eine EID_{50} von weniger als 1 pfu kann auftreten, da die Viren zuvor auf MDCK-Zellen getitert wurden und sich die meisten Influenzaviren hoch effizient in diesen Zellen vermehren.

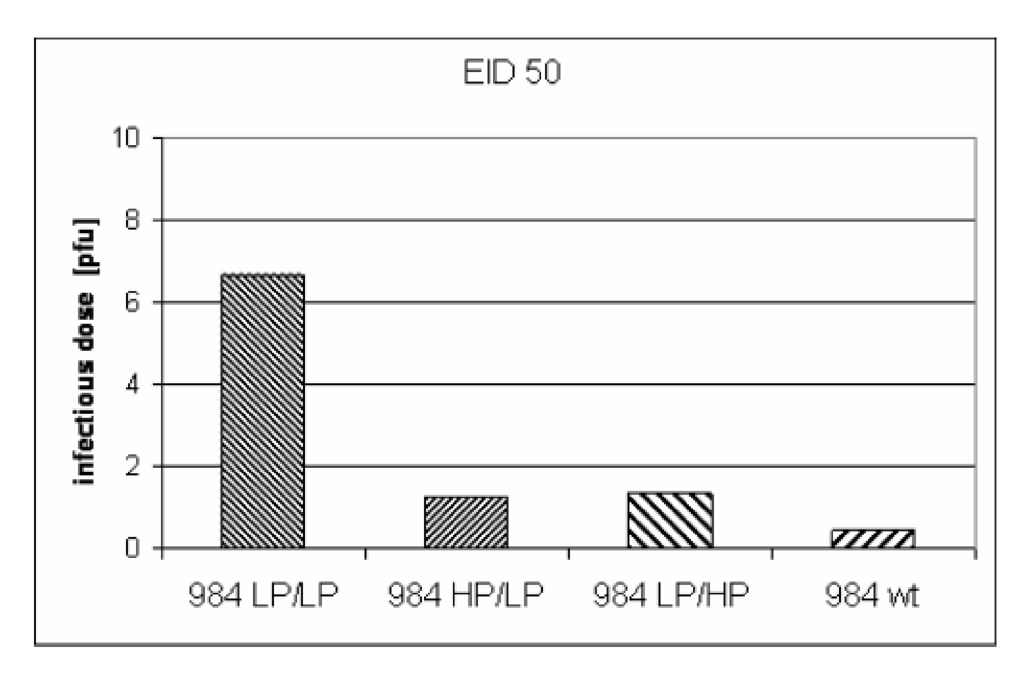


Abb. **4.15** 11 Tage alte Hühnerembryonen wurden mit den verschiedenen NS1-Mutanten in 10er Verdünnungsschritten beimpft. 48h p.i. wurde die Allantoisflüssigkeit der Eier mittels HA-Test auf Viruswachstum untersucht. Die EID_{50} beschreibt die Virusdosis bei der genau die Hälfte der inokulierten Embryos infiziert wird.

4.5.4 Intrazelluläre Lokalisation der NS1-Mutanten

Das NS1-Protein der niedrig- und hochpathogenen Viren unterscheidet sich unter anderem in 2 Aminosäureaustauschen im NES. Daher wurde die Lokalisation in den Zellkompartimenten mittels Zellkern - Zytoplasma Auftrennung und quantitativer Auswertung im Western Blot untersucht. Im Western Blot wurde NS1 und β-Aktin (als Zytoplasma-Marker) detektiert (Abb. 4.16A). In Abbildung 4.16B ist quantitativ ausgewertet zu sehen, dass beide Viren mit hochpathogenem Kernexportsignal (984 HP/LP; 984 wt) eine erhöhte Konzentration des NS1-Proteins im Zytoplasma zeigen. Bei der Variante 984 HP/LP und 984 LP/LP ist deutlich weniger NS1 im Kern lokalisiert.

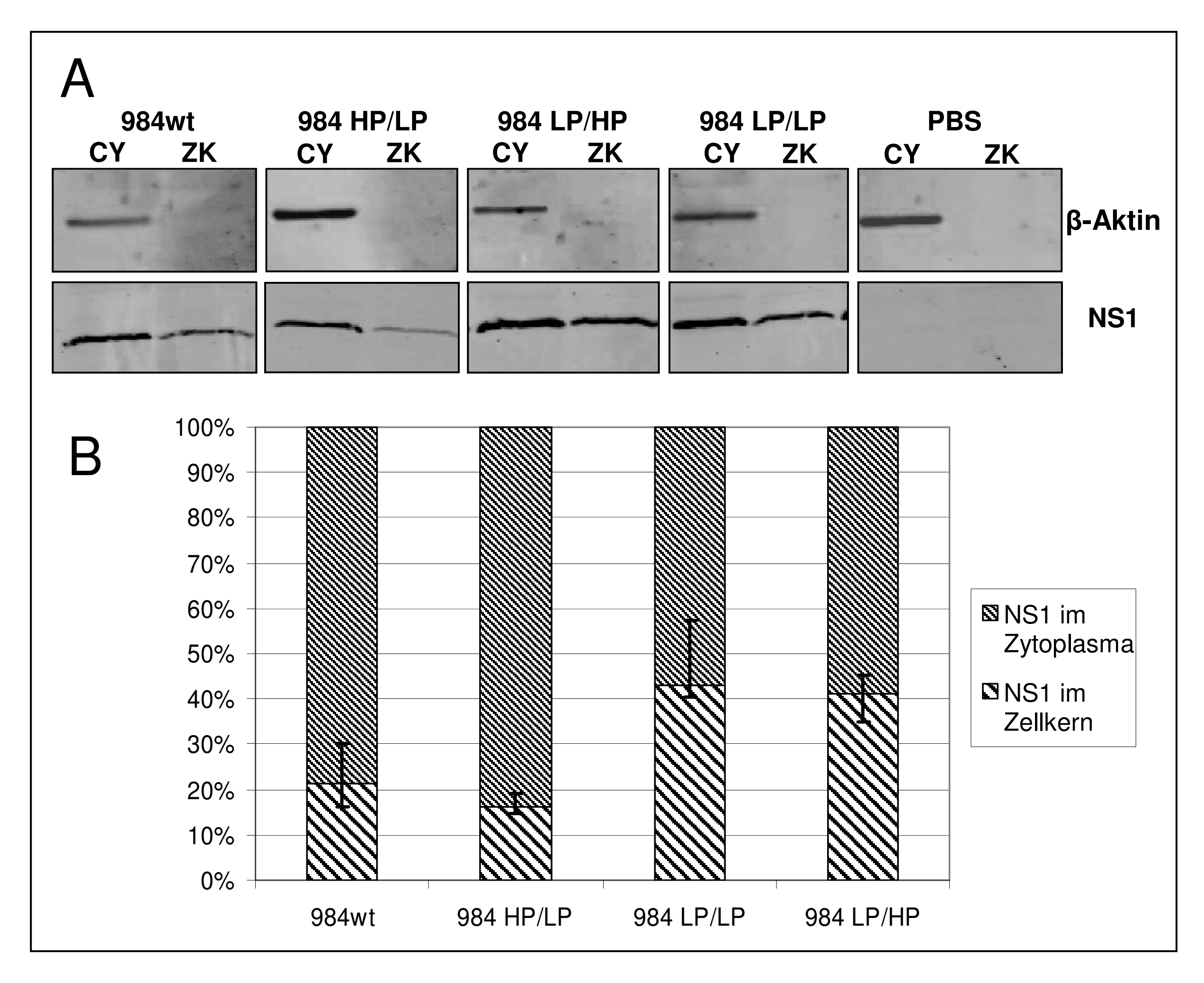


Abb. **4.16** Detektion von NS1-Protein in Zellkern- (ZK) und Zytoplasma- (CY) Fraktion von infizierten Hühnerembryofibroblasten (A). Die Zellen wurden mit einer MOI von 2 der NS1-Mutanten infiziert und 7,5h nach Inokulation fraktioniert. β-Aktin wurde als Kontrolle für die Zytoplasma-Fraktion verwendet. Die Quantifizierung (B) der Banden wurde mit Hilfe der Odyssey Infrared Imaging Software durchgeführt.

Um die durch Fraktionierung festgestellte Lokalisation des NS1 zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Dazu wurden primäre Hühnerembryofibroblasten mit den verschiedenen NS1-Mutanten mit einer MOI von 2 infiziert und nach 7,5 Stunden für die Immunfluoreszenz fixiert. Das NS1-Protein ist in Abb. 4.17 rot dargestellt; die Zellkerne der Zellen wurden mit DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol) angefärbt und erscheinen blau.
Das NS1 des 984wt-Virus ist sowohl in den Nukleoli als auch im Zytoplasma vorzufinden. Im Zellkern kann außerhalb der Nukleoli nur sehr wenig NS1 detektiert werden (siehe Abb 4.17A+a). Das NS1 der Virusmutante mit niedrigpathogener NES-Sequenz und deletiertem C-Terminus (984 LP/HP) ist in der Immunfluoreszenz nur sehr schwach im Zytoplasma zu beobachten, wohingegen die Nukleoli verstärkt NS1 aufweisen (4.17B+b). Die übrigen Bereiche des Zellkerns scheinen frei von NS1-Protein zu sein. Das NS1-Protein der 984

HP/LP-Mutante ist wie aus Abbildung 4.17D+d vorranging im Zytoplasma vorzufinden. NS1 im Zellkern ist nicht im Nukleolus akkumuliert. Beim 984 LP/LP-Virus sind die NS1-Proteine über die gesamte Zelle verteilt, und es findet ebenfalls keine Akkumulation in den Nukleoli statt (4.17E+e)

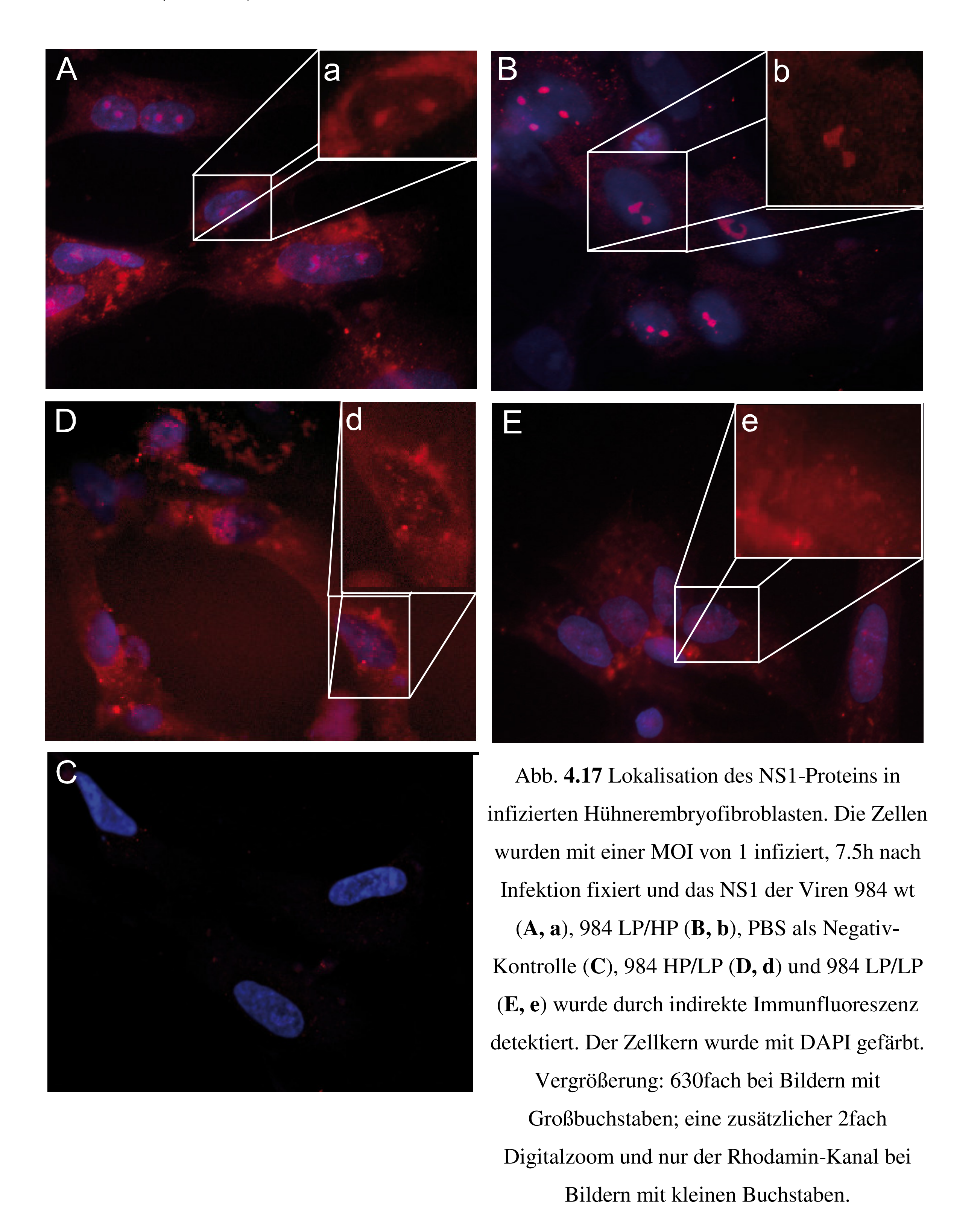


Abb. **4.17** Lokalisation des NS1-Proteins in infizierten Hühnerembryofibroblasten. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert, 7.5h nach Infektion fixiert und das NS1 der Viren 984 wt (**A, a**), 984 LP/HP (**B, b**), PBS als Negativ-Kontrolle (**C**), 984 HP/LP (**D, d**) und 984 LP/LP (**E, e**) wurde durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. Vergrößerung: 630fach bei Bildern mit Großbuchstaben; eine zusätzlicher 2fach Digitalzoom und nur der Rhodamin-Kanal bei Bildern mit kleinen Buchstaben.

4.5.5 Interferon-Antagonismus der NS1-Mutanten

Um eine Erklärung für die in 4.5.1 beobachteten Wachstumsunterschiede der rekombinanten NS1-Mutanten zu finden, wurde die Induktion des Interferon-β-mRNA Niveaus durch die virale Infektion untersucht. Die Induktion der Interferon-β-mRNA-Mengen wurde mittels RT-PCR (siehe Kap 3.7.1 und 3.7.2) und Interferon-β-mRNA-spezifischen Primern überprüft. Zusätzlich wurde eine RT-PCR zur Amplifikation der β-Aktin-mRNA als Kontrolle durchgeführt.

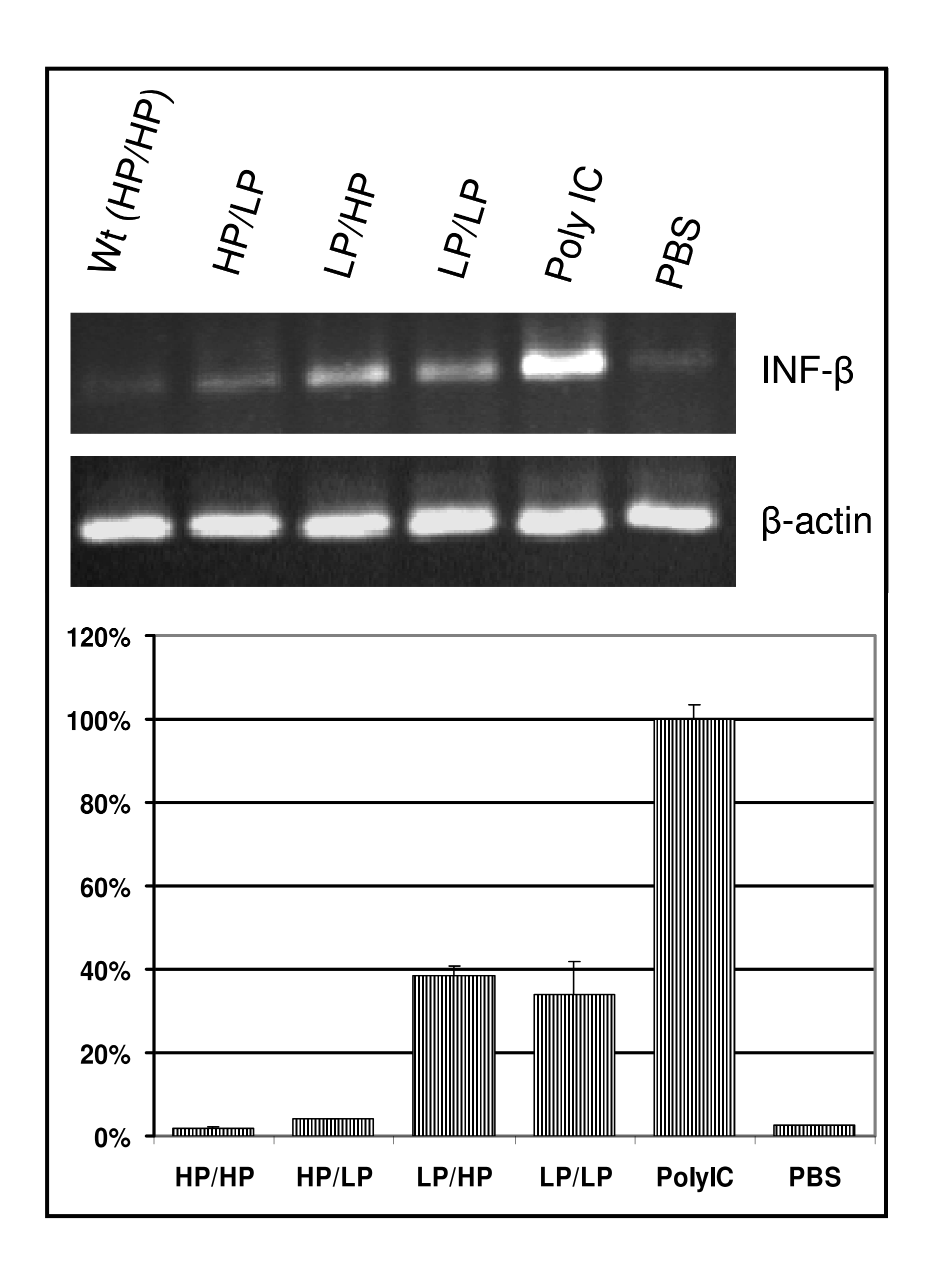


Abb **4.18** Induktion von Interferon-β (INF-β) durch Infektion der NS1-Mutanten 984wt, 984 LP/HP, 984 HP/LP and 984 LP/LP in Hühnerembryofibroblasten. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 infiziert (entspr. Kochs et al., 2007). 7,5h nach Inokulation wurde zelluläre RNA isoliert und durch

Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Agarosegel auf die mRNA-Menge von IFN-β und β-Aktin untersucht. Die Banden wurden mit Hilfe der Software ImageJ (National Institute of Health, USA) quantifiziert. RNA aus Zellen, die als Positivkontrolle mit polyIC transfiziert wurden, entsprechen einer 100%igen Induktion von INF-β-mRNA Transkription.

Vergleicht man die in Abb. 4.18 dargestellten mRNA-Mengen, die 7,5h nach Infektion beobachtet wurden, fällt auf, dass diese im Fall des 984wt-Virus am stärksten reduziert sind. Sie beträgt nur 1,9% der Menge der Positivkontrolle (Transfektion der Zellen mit PolyIC). Nur geringfügig mehr Induktion ist mit 4% bei einer Infektion mit dem 984 HP/LP-Virus zu erkennen. Im Vergleich zu diesen beiden Viren kommt es durch die Infektion mit den Mutanten mit niedrigpathogener NES-Sequenz (984 LP/LP und 984 LP/HP) zu einer Hochregulierung der Interferon-β-mRNA-Transkription. Diese beträgt 34% bzw. 39% der Induktion durch polyIC, ist aber gegenüber der PBS-Kontrolle um das 13-15fache erhöht. Der Interferon-β-Antagonismus korreliert offenbar mit dem Vorhandensein der hochpathogenen NES-Sequenz im NS1-Protein, welche zu einer Akkumulation des Proteins im Zytoplasma führt.

5. Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Aviäre Influenza A-Viren werden aufgrund der durch sie hervorgerufenen Erkrankungen in domestiziertem Geflügel in die Gruppen der niedrigpathogenen (LPAI-Viren) und hochpathogenen Viren (HPAI-Viren) unterteilt. Während niedrigpathogene Viren in den meisten Fällen nur durch milde Krankheitssymptome und verringerte Eiproduktion auffällig werden, stellen hochpathogene aviäre Influenza A-Viren ein massives Risiko für die Geflügelindustrie dar, da diese Viren Mortalitätsraten von bis zu 100% verursachen können. Des Weiteren sind einige dieser Viren (H5N1, H7N7) in der Lage, Menschen zu infizieren und dort teils schwerwiegende Krankheitsverläufe zu verursachen. Ausbrüche solcher HPAI-Viren treten immer wieder in Geflügelfarmen in der ganzen Welt auf und führen in sehr wenigen Fällen auch zu Infektionen im Menschen. Der Ausbruch eines hochpathogenen aviären H7N7-Virus führte beispielsweise im Februar 2003 in den Niederlanden zum Tod eines Veterinärs. Bei weiteren 89 Personen, die alle sehr engen Kontakt mit infiziertem Geflügel hatten, konnte ebenfalls eine Infektion nachgewiesen werden (Fouchier et al., 2004). Die 1997 erstmals in Hongkong aufgetretenen und immer noch kursierenden hochpathogenen aviären H5N1-Viren führten bis heute zur Infektion von 369 Menschen, von denen 234 tödlich verliefen (WHO-Internetseite). Trotz der relativ hohen Mortalitätsrate dieser Influenzaviren im Menschen handelt es sich jedoch nach wie vor um einen Tierseuchenerreger. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte eine Übertragung von Mensch zu Mensch nach Informationen der WHO nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Der relativ geringen Zahl menschlicher Opfer, stehen gegenüber: 30 Millionen tote Vögel im Fall von H7N7 und mehr als 150 Millionen Vögel, die bis jetzt durch das H5N1-Virus zu Tode gekommen sind.

Die Virusisolate, die in dieser Arbeit verwendet wurden, konnten während eines Ausbruchs von Viren des Subtyps H7N1 in Norditalien in den Jahren 1999/2000 isoliert werden. Im Dezember 1999 kam es dort in Geflügelzuchtbetrieben zum ersten Auftreten von HPAI-Viren, welche sich aus zuvor grassierenden Viren niedriger Pathogenität (LPAI-Viren) entwickelt hatten (Banks et al., 2000). Das Hämagglutinin (HA) der HPAI-Isolate wies eine multibasische Spaltstelle auf, welche als Grundvoraussetzung für die hohe Pathogenität dieser Viren gilt. Das HA von Viren mit einer solchen Spaltstelle kann von der ubiquitär vorkommenden, zellulären Protease Furin in die Untereinheiten HA_1 und HA_2 gespalten und

damit aktiviert werden (Klenk et al., 1988). LPAI-Viren mit einem HA mit mono- oder dibasischer Spaltstelle können hingegen erst auf der Zelloberfläche oder nach Virusfreisetzung durch exogene Proteasen nachgespalten werden (Garten et al., 1981; Klenk und Garten 1994).
Das HA der hochpathogenen Isolate unterscheidet sich des Weiteren durch eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle an Position 123 in der Nähe der Rezeptorbindungstasche von dem der meisten LPAI-Viren. Diese besitzen entweder ein Glykan an Position 149 oder keine zusätzliche Glykosylierung in diesem Bereich. Das Vorhandensein solcher Glykane wurde zuvor mit der notwendigen Balance zwischen Rezeptorbindungsaffinität des HAs und der Rezeptor-zerstörenden Aktivität der viralen Neuraminidase in Verbindung gebracht (Wagner et al., 2000). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der zusätzlichen Glykane auf die Pathogenität anhand rekombinant hergestellter Viren zu untersuchen, die sich ausschließlich in diesem Merkmal voneinander unterscheiden.
Neben dem HA gilt das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) von Influenza A-Viren als bedeutender Virulenzfaktor. Dieses besitzt die Fähigkeit, durch Verhinderung des Exports zellulärer mRNA aus dem Kern (Noah et al., 2003) und seine Funktion als IFN-α und IFN-β Antagonist (Solorzano et al., 2005) sowie zusätzlicher Interaktionen mit RNA und anderen zellulären Proteinen, den Infektionsverlauf entscheidend zu beeinflussen. Dundon et al. (2006) konnte durch Sequenzanalysen von 40 Virusisolaten der oben genannten Italien-Epizootie zeigen, dass alle HPAI-Viren eine C-terminale Trunkierung von 6 Aminosäuren im NS1 aufweisen, die nicht bei den niedrigpathogenen Viren auftrat. In der vorliegenden Arbeit konnten weitere zwei Mutationen im Kernexportsignal des NS1 (V136I / D139N) zwischen LPAI- und HPAI-Viren aufgedeckt werden. Die Auswirkungen der Mutationen im NS1-Protein der HPAI-Viren sollte ebenfalls mit Hilfe rekombinanter Viren untersucht werden.

5.2 Charakterisierung reassortierter Influenzaviren

Influenza A-Viren besitzen ein segmentiertes RNA-Genom (siehe Kap. 1.3). Somit ist es möglich, aus reversen Genetik-Systemen zweier Viren, Virusreassortanten herzustellen, die Segmente von zwei verschiedenen Influenzaviren tragen. Wie in Tab. 4.1 zu sehen, wurden in dieser Arbeit, aus den rekombinanten Systemen des hochpathogenen 984- und des niedrigpathogenen 1082-Virus Einzelreassortanten hergestellt, deren Genom aus jeweils sieben Segmenten des 984-Virus und je einem Segment des 1082-Virus besteht. Es konnte

gezeigt werden, dass nur der Austausch des HA- und NS-Segments zu einer signifikanten Veränderung im Wachstumsverhalten der Viren auf aviären Zellen führte (siehe 4.2.3). Diese Veränderung konnte auf nur wenige Unterschiede in der Genomsequenz zurückgeführt werden (4.2.4 und 4.2.5). Die HA-Proteinsequenz des niedrigpathogenen 1082-Virus wies neben einer monobasischen Spaltstelle nicht die zusätzlich N-Glykosylierung des hochpathogenen 984-Virus im Bereich der Rezeptorbindungsstelle auf. Die Zugabe von Trypsin in den Überstand der mit 984/1082HA-Virus infizierten Zellen (zur Nachspaltung des HAs mit monobasischer Spaltstelle) führte nicht zur vollständigen Wiederherstellung der Virustiter des 984-Virus mit multibasischer Spaltstelle im HA. Der Unterschied im Wachstumsverhalten wurde daher auf die zusätzliche N-Glykosylierung des HAs des hochpathogenen 984-Virus zurückgeführt. Das NS-Segment kodiert für zwei Proteine (NS1 und NS2), wobei jedoch zwischen den beiden untersuchten Viren nur das NS1 Unterschiede in der Proteinsequenz aufwies. Somit konnten neben der Glykosylierung des HAs, auch diese Mutationen im NS1 als Pathogenitätsdeterminaten identifiziert werden.

5.3 Die HA-Kopfglykane als Pathogenitätsdeterminante aviärer Influenza A-Viren

Das Hämagglutinin von Influenza A-Viren hat im Verlauf des Infektionszyklus zwei Funktionen zu erfüllen, die für eine effiziente Virusvermehrung unabdinglich sind. Zum einen hat es die Fähigkeit, nach vorangegangener Endozytose des Viruspartikels virale und zelluläre Membran zu fusionieren, was zu einer Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma führt. Die zweite Funktion des HAs ist es, an endständige Neuraminsäuren glykosylierter Membranbestandteile als Rezeptormolekül auf der Zielzelle zu binden. Diese Fähigkeit kann das Virus jedoch ebenfalls mit einem schwerwiegenden Problem bei der Freisetzung neugebildeter Partikel konfrontieren. Hierbei kann es dazu kommen, dass das HA dieser Viren an die bereits infizierte Zelle bindet oder die Viren miteinander verklumpen. Dieses Problem wird von der ebenfalls in der Virusmembran verankerten Neuraminidase gelöst, die die Neuraminsäuren auf der Zell- und Virusoberfläche hydrolytisch abspaltet. Ist die Bindung des Rezeptors durch das HA jedoch zu stark, können sich die neugebildeten Viren nicht effizient von der infizierten Zelle lösen. Andererseits kann ein Virus mit starker Neuraminidaseaktivität und schwacher Rezeptorbindungsfähigkeit schlecht an neue Zielzellen binden. Die Effizienz der HA- und NA-Aktivität sollten ausbalanciert sein, um eine produktive Virusvermehrung zu gewährleisten (Wagner et al., 2000). Oligosaccharide an der

Spitze des HAs können die Affinität des Virus zu Neuraminsäuren auf Erythrozyten und anderen Zellen herabsetzen (Crecelius et al., 1984; Deom et al., 1986; Ohuchi et al., 1997). Diese Affinitätsverringerung basiert wahrscheinlich auf einer sterischen Behinderung der Zugänglichkeit der Rezeptorbindungstasche.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass die Schaffung eines zusätzlichen N-Glykans in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle eine bevorzugte Möglichkeit für das Virus darstellt, die Bindungsaffinität zum zellulären Rezeptor zu reduzieren. Wie in Kap. 4.4.5 dargestellt, führt dieser Effekt dazu, dass die Virusfreisetzung aus infizierten Zellen verstärkt wird. Ein Ausbruch, wie er 1999/2000 in Norditalien stattfand, begünstigt evolutionär solche Viren, die sich besonders schnell in und zwischen den Wirten ausbreiten können. Geflügelfarmen stellen für das Virus eine Ansammlung von Wirten dar, wie sie bei Wildvögeln in freier Natur nicht vorzufinden ist. Dort ist die Distanz zwischen zwei Wirten meist sehr viel größer, so dass es für das Virus nachteilig wäre, schnell zu replizieren und dadurch seinen Wirt schnell zu töten. In der Massentierhaltung hingegen steht dem Virus eine große Menge an Wirten auf engem Raum zur Verfügung, wobei Virusmutanten bevorzugt werden, die möglichst schnell viele Nachkommenviren produzieren und freisetzen. Langsam replizierende Viren werden hierbei überwachsen und ausselektiert.

Das Glykan an Position 123 (G1) hat einen deutlich positiveren Effekt auf die Virusfreisetzung und -vermehrung als die zusätzliche Glykosylierung an Position 149 des HAs (G2). Im Überstand infizierter Hühnerembryozellen ist dieser Unterschied besonders deutlich, während G1 und G2 im Überstand von Enten- und Putenembryozellen annähernd den gleichen Titer aufweisen. Das G0-Virus ohne Glykan an der Rezeptorbindungsstelle wächst in den Zellen aller getesteten aviärer Spezies zu den geringsten Titern heran (siehe Kap 4.4.1). Beide zusätzlichen Glykosylierungsstellen des HAs sind im Verlauf der Italien-Epizootie zwar aus einem gemeinsamen Vorgänger, jedoch getrennt voneinander, entstanden (Banks et al., 2001). Die Glykosylierung an Position 149 (G2) stellt möglicherweise eine Anpassung an Puten und Enten dar, während die G1-Variante als evolutionärer Vorteil in Hühnern entstanden sein könnte.

Eine weitere, bereits durch Skehel et al. (1984) sowie Wiley und Skehel (1987) beschriebene Funktion zusätzlicher Glykane in den Kopfbereichen der HA-Proteine, ist es, dem immunologischen Druck des Wirtes durch das Verdecken antigener Epitope zu entkommen. Da es sich bei den untersuchten Tieren in dieser Arbeit um Hühnerembryonen handelt, die noch nicht über ein ausgereiftes Immunsystem verfügen, können hierzu keinerlei Aussagen gemacht werden.

Beobachtungen, nach denen zusätzliche Glykane am HA die Pathogenität und Virulenz von Influenzaviren in Hühnern erhöhen (Desphande et al., 1987; Matrosovich et al., 1999), konnten durch die Bestimmung der mittleren Todeszeit (MDT; siehe Kap 4.4.3) der untersuchten Glykosylierungsmutanten in Hühnerembryonen bestätigt werden. Das Glykan an Position 149, und besonders das an Position 123 tragen zum beschleunigten Tod der infizierten Embryonen bei.

Beim Stamm A/FPV/Rostock/34 (H7N1), welcher ebenfalls über die beiden zusätzlichen Glykane an Position 123 und 149 des HAs verfügt, konnte von Feldmann et al. (2000) gezeigt werden, dass die hohe Pathogenität des Virus mit einer systemischen Verbreitung im Hühnerembryo assoziiert ist. Diese beruht auf der Infektion des Endothels, das die Wände der Blutgefäße in sämtlichen Organen des Körpers auskleidet. Im infizierten Hühnerembryo kann man beim G2- und G0-Virus gegenüber dem G1-Virus eine deutlich verringerte Infektion des Endothels beobachten (vg. Abb. 4.6). Besonders die G0-Mutante ist in den endothelialen Bereichen der großen Blutgefäße (Abb. 4.6B) sowie dem Endokard (Abb. 4.6F), das die Innenwände des Herzens auskleidet, kaum mehr nachzuweisen. Trotzdem können sich alle Glykosylierungsmutanten systemisch im Hühnerembryo ausbreiten (siehe Abb. 4.5). Hierbei fällt auf, dass G0 besonders das Herz und hier vermutlich Myozyten infiziert, wie es bereits bei einem anderen hochpathogenen Virus (A/turkey/England/50-92/91 (H5N1)) nachgewiesen werden konnte (Kobayashi et al., 1996).

Das G2- wie auch das G1-Virus können im Entenembryo im Endothel der großen Blutgefäße detektiert werden (Abb. 4.7 C+D), während das G0-Virus dort nicht nachzuweisen ist (Abb. 4.7 B). In den kleineren, sich entwickelnden Gefäßen der Lunge, des Herzens und des Magens kann jedoch G0, wie auch G1 und G2, beobachtet werden. In den infizierten Putenembryonen kann bei allen Virusmutanten eine Replikation im Endothel, sowohl der großen als auch der kleinen Gefäße detektiert werden (siehe Abb. 4.8). Auch in diesen Embryonen ist das Signal der G2-, besonders jedoch das der G0-Mutante deutlich schwächer als das des G1-Virus.

Auf molekularer Ebene konnte für keine der Glykosylierungsmutanten eine Präferenz für die Bindung an α2-3 oder α2-6 gebundene, endständige Neuraminsäuren festgestellt werden (Kap 4.4.4). Alle Viren konnten besser α2-3 als α2-6 verlinkte Neuraminsäuren binden, wie es für die meisten aviären Influenzaviren beschrieben wurde (Rogers und Paulson 1983; Connor et al., 1994; Gambaryan et al., 2003; Matrosovich et al., 2004). Die zuvor beobachteten Unterschiede in Wachstum, Verbreitung und Pathogenität der Viren lassen sich nicht durch die Bevorzugung verschiedener Rezeptoren durch die einzelnen Glykosylierungsmutanten erklären. Die Menge freigesetzter, neugebildeter Viruspartikel ist

jedoch durch die zusätzliche Glykosylierung des HAs gegenüber der G0-Mutante deutlich erhöht (siehe Kap. 4.4.5). Dies kann möglicherweise in einer stärkeren Bindung des unglykosylierten HAs zum zellulären Rezeptor begründet sein (siehe Abb. 5.1). Obwohl die virale Neuraminidase nicht in der Lage ist, direkt an das HA gebundene Neuraminsäuren abzuspalten, könnte eine häufigere kurzzeitige Rezeptorablösung des glykosylierten HAs dazu führen, dass die Neuraminidase vermehrt die Möglichkeit erhält, die Rezeptoren zu entfernen. Dies hätte eine vermehrte Freisetzung neugebildeter Viren zur Folge, wie sie beim G1- und G2-Virus in Abb. 4.11 dargestellt ist.

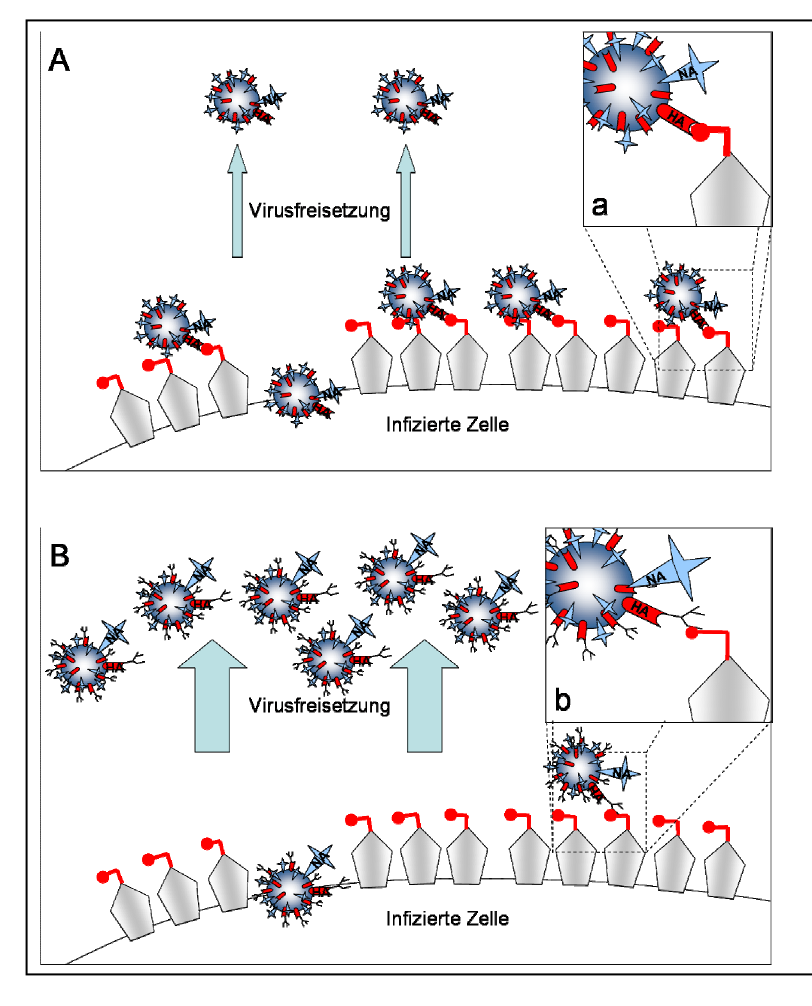


Abb. **5.1** Modell der verbesserten Freisetzung von Viren mit zusätzlichem Glykan in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinins.

A Bei Viren ohne Glykan nahe der Rezeptorbindungstasche kommt es zu einer verringerten Freisetzung neugebildeter Viruspartikel. Viele Viren bleiben durch die feste Bindung des HAs an die Rezeptoren ( ) auf der Zelloberfläche haften (**a**).

B Viren mit zusätzlichem Glykan nahe der Rezeptorbindungsstelle besitzen eine verringerte Affinität zum zellulären Rezeptor ( ). Dies erleichtert der viralen Neuraminidase die Abspaltung des Rezeptormoleküls von der Oberfläche der infizierten Zelle (**b**). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Freisetzung neu-synthetisierter Viruspartikel.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass zusätzliche Glykane nahe der Rezeptorbindungstasche des HAs den Prozess der Virusablösung von der infizierten Zelle verbessern können, was höchst wahrscheinlich zu der beschleunigten Virusausbreitung im aviären Wirt führt. Die schnelle Ausbreitung führt vermutlich auch zu einem „Überrennen“ des angeborenen Immunsystems des Wirtes, was sich in der gesteigerten Pathogenität des G1-Virus zeigt. Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass der Erwerb zusätzlicher Glykane am Hämagglutinin ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal aviärer Influenzaviren darstellt,

welches bei weiteren Ausbrüchen von aviären Influenza A-Viren in domestiziertem Geflügel als Warnsignal für eine mögliche Beschleunigung der Virusausbreitung gesehen werden muss.

5.4 Mutationen der Lokalisationssignale des NS1 beeinflussen die Virulenz aviärer Influenzaviren

Das NS1-Protein von Influenza A-Viren kann mit einer großen Anzahl von zellulären Faktoren sowohl Protein-Protein als auch Protein-RNA-Interaktionen eingehen (Krug et al., 2003; Li et al., 2006; Chien et al., 2004; Hatada und Fukada, 1992; Nemeroff et al., 1998). Diese Wechselwirkungen sind für eine effiziente Virusvermehrung essentiell, da sie beispielsweise die Auswirkungen als auch die Aktivierung der angeborenen Immunantwort des Wirts supprimieren können. Die Hauptfrage hierbei ist, wie diese mannigfaltigen Interaktionen optimal für die Virusreplikation in den verschiedenen Phasen des Infektionszyklus reguliert werden. Das NS1-Protein besitzt durch zwei Kernlokalisationssignale (Greenspan et al., 1988), das Kernexportsignal (Li et al., 1998), sowie das Nukleoluslokalisationssignal (Melén et al., 2007), die Möglichkeit, die Lokalisation zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zu variieren und entsprechend seine Interaktionspartner zu verändern. Die Kernlokalisationssignale, sowie das Nukleoluslokalisationssignal bestehen vorwiegend aus basischen Aminosäuren, während das Kernexportsignal (Aminosäurepositionen 134-147) aus hydrophoben Aminosäuren besteht und zudem durch einen bislang unbekannten viralen Faktor gesteuert wird, ohne den es nicht funktionell ist (Li et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass das NS1 der hochpathogenen Virusisolate Mutationen in dem Kernexportsignal (NES) sowie eine Deletion des C-Terminus aufweist (siehe Kap. 4.2.5). Aus dieser C-terminalen Trunkierung ergibt sich eine Wiederherstellung des Nukleoluslokalisationssignals (NoLS), das ausschließlich bei Viren des hochpathogenen Phänotyps vorzufinden ist. Dieses ist C-terminal normalerweise an Aminosäureposition 219 bis 230, bzw. 219 bis 237 (je nach Virusisolat) gelegen und beinhaltet mehrere der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Bei vielen aviären Isolaten wird dieses NoLS durch die saure Aminosäure Glutamat an den Aminosäurepositionen 227 und 229 ausgeschaltet (Melén et al., 2007). Frühe Italien-Isolate niedrigpathogenen Phänotyps weisen diese sauren Aminosäuren auf (Dundon et al., 2006). Die Deletion dieser Glutaminsäuren führt zum

Verlust des nicht-basischen Glutamats an Position 227 und 229 und somit zur Aufhebung der Hemmung des NoLS. In dieser Arbeit konnte, wie in Abb. 4.17 A, B, D und E gezeigt, auch für aviäre Zellen bestätigt werden, dass das Entfernen der Glutaminsäuren an Position 227 und 229 des NS1 zur Relokalisation des Proteins in den Nukleolus führt. Des Weiteren scheint auch eine Verkürzung des C-Terminus auf 224 Aminosäuren auszureichen, um dennoch ein funktionelles NoLS zu beinhalten.

C-terminale Verkürzungen des NS1 können im Genom vieler Influenza A-Virus-Subtypen nachgewiesen werden, wie beispielsweise in H1N1, H2N2, H3N2, H9N2 (Dundon et al., 2006), H3N8 (MacRae et al., 2005) und sogar in einem humanen H5N1-Isolat (A/Vietnam/1203/04), das nachweislich im Frettchen-Modell zu schwersten Krankheitsverläufen führte (Govorkova et al., 2005). Wie aus Kap. 4.5.2 und 4.5.3 hervorgeht, weist das HPAI 984-Virus mit verkürztem C-terminalen Ende ebenfalls eine Erhöhung der Pathogenität, im Besonderen jedoch der Infektiosität in Hühnerembryonen auf. In vorangegangenen Arbeiten (Krug und Soeiro, 1975) konnte gezeigt werden, dass NS1 im Nukleolus zur Inhibition der rRNA-Synthese führt. Für andere Viren gibt es Belege, dass virale Proteine im Nukleolus dazu führen, dass die virale Transkription und Translation bevorzugt wird oder dass der Zellzyklus auf die viralen Bedürfnisse abgestimmt wird (Hiscox, 2002). Die vorwiegende Lokalisation der viralen Nukleokapsidproteine des Dengue-, Kunjin- und des Japanese-Encephalitis-Virus spielt in der viralen Replikation und Pathogenese in Säugerzellen eine wichtige Rolle (Mori et al., 2005; Wang et al., 2002; Westaway et al., 1997). Durch direkte Interaktion mit Proteinen wie Nukleolin und B23 können beispielsweise Adenoviren eine Steigerung der viralen Replikation bewirken (Matthews et al., 2001; Okuwaki et al., 2001).

Abgesehen von der Wiederherstellung des NoLS, führt die Trunkierung des C-Terminus des NS1 zum Wegfall bzw. zur Veränderung weiterer für diesen Teil des Proteins beschriebener Funktionen. Chen et al. (1999) konnte nachweisen, dass sich zwischen Position 223 und 237 des NS1-Proteins eine PABII-Binde-Domäne befindet. Diese wurde durch die bei den HPAI-Viren aufgetretene Deletion fast vollständig zerstört, war jedoch bereits bei dem NS1 der LPAI-Viren mit 230 Aminosäuren nur verkürzt vorzufinden. Die HPAI-Viren mit verkürztem NS1-Protein replizierten jedoch besser in Hühnerzellen (siehe Kap. 4.5.1) und infizierten embryonierte Hühnereier besser als die Virusmutanten mit 230 Aminosäuren langem NS1-Protein und somit potentiell noch vorhandener Bindestelle (Kap. 4.5.3). Die Interaktion zwischen NS1 und PABII führt normalerweise dazu, dass der Export zellulärer mRNAs aus dem Zellkern gehemmt wird. Die vollständige Deletion dieser Domäne des NS1 sollte

eigentlich zu verringerter Virulenz führen; das Gegenteil von dem, was in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Daraus läßt sich schließen, dass bereits die 230 Aminosäuren lange LPAI NS1-Variante höchstwahrscheinlich nicht mehr zu einer starken Interaktion mit dem PABII-Protein in der Lage ist und somit diese Funktion des C-Terminus des NS1 bei den untersuchten Virusisolaten nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die 4 letzten Aminosäuren am C-Terminus des NS1 können des Weiteren als PDZ-Domänen-Ligand dienen (Obenauer et al., 2006). Durch die Bindung ihrer PDZ-Domänen an andere Proteine können sich Multiproteinkomplexe ausbilden, die in vielen zellulären Funktionen wie der Signaltransduktion und dem intrazellulären Transport von Proteinen eine wichtige Rolle spielen (Jeleń et al., 2003). Obenauer et al. konnten zeigen, dass die C-terminale Aminosäuresequenz der häufigsten Vertreter der aviären Influenzaviren (-ESEV) über 30 humane Proteine mit PDZ-Domänen effektiv bindet. Hingegen bindet die aktuell am häufigsten vorkommende humane C-terminale NS1-Sequenz (RSKV) diese Proteine nicht, bzw. nur eingeschränkt. Obwohl über die Interaktion von PDZ-Domänen in aviären Zellen wenig bekannt ist, ist davon auszugehen, dass eine Minimierung des Einflusses des NS1 auf zelluläre Proteine mit PDZ-Domänen von Vorteil wäre, da es nicht zur Zerstörung vieler zellulärer Signal- und Transportwege kommen würde. Die C-terminale Deletion des NS1 kann daher auch als notwendige Entwicklung vor der Entstehung des HPAI NES-Signals zu sehen sein, da dieses, wie aus 4.5.4 hervorgeht, zu einer Zunahme des Exports von NS1 in das Zytoplasma führt. Diese Zunahme des nukleären Exports wird durch die beiden Mutationen (I136V/N139D) ausgelöst, was, wie die C-terminale Deletion, zu einer Erhöhung der Infektiosität und der Pathogenität führt (vgl. MDT und EID50 von 984wt und 984LP/HP in Abb. 4.14 und 4.15). Die auch in den Immunfluoreszenzaufnahmen in Abb. 4.17 A und D erkennbare Verstärkung der Export-Fähigkeit des NS1 mit der NES-Sequenz der HPAI-Viren gegenüber dem Signal der LPAI-Viren (Abb. 4.17D und E) korreliert mit einer Inhibition der IFN-β-mRNA Produktion. In Abb. 4.18 ist gezeigt, dass die Mutationen im NES des NS1 der hochpathogenen Viren, unabhängig von dem, durch die Deletion des C-Terminus entstandene, NoL-Signal zu einer Abnahme der IFN-β mRNA-Menge führen. Eine größere Menge des NS1-Proteins im Zytoplasma kann durch vielfältige Interaktionen die Induktion von IFN-β entsprechend stärker hemmen. Es wurde gezeigt, dass die PKR-Kinase, welche normalerweise Doppelstrang-RNA identifizieren kann, im Zytoplasma durch NS1 gebunden wird, was zu einer Unterbrechung des Interferon-Verstärkungs-Zyklus führt (Li et al., 2006). Auch RIG-I, ein zelluläres Protein, das ebenfalls im Zytoplasma vorzufinden ist, kann die 5´-Phosphat-Gruppen von nicht-zellulärer RNA erkennen und dadurch die IFN-β induzieren (Pichlmaier et

al., 2006). NS1 kann durch direkte oder indirekte Bindung diese Aktivierung und somit den Übergang der infizierten Zelle in den antiviralen Status blockieren (Hatada und Fukuda, 1992, Min und Krug, 2006). Durch Inhibierung von IRF-3 und NF-κB im Zytoplasma kann NS1 ebenfalls die IFN-β Transkription reduzieren (Talon et al., 2000, Wang et al., 2000).
Eine erhöhte Konzentration an NS1-Protein im Zytoplasma kann durch die Interaktion mit dem eukaryotischen Translationsinitiator eIF4G zu einer verstärkten Translation viraler mRNAs führen (Burgui et al., 2003; Aragon et al., 2000). Des Weiteren sind in der frühen Infektionsphase apoptotische Prozesse als antiviraler Mechanismus für den viralen Replikationzyklus hinderlich. Der apoptotische Prozess durch die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges wird beispielsweise durch die Bindung von NS1 an die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) im Zytoplasma verhindert (Zhirnov und Klenk 2007; Ehrhardt et al., 2007). Zudem konnte beobachtet werden, dass die N-terminale Domäne des NS1-Proteins für die Kontrolle der Caspase-1 abhängigen Apoptose in infizierten primären humanen Makrophagen zuständig ist (Stasakova et al., 2005).
Weitere Vorteile, die sich aus der vorrangig zytoplasmatischen Akkumulation des NS1 ergeben, ist die verstärkte Interaktion mit der 2′-5′ Oligo (A) Synthetase. Hierdurch wird die Aktivierung des RNaseL-Signalwegs inhibiert, was eine Degradation zellulärer und viraler RNA zur Folge hätte und für das Virus von Nachteil wäre (Min und Krug 2006).
De la Luna et al. (1995) konnten zeigen, dass NS1 zu einer Erhöhung der viralen Translation beitragen kann, was eine Erklärung für die gesteigerten Wachstumsraten der NS1-Mutanten mit hochpathogenem NES darstellt (vgl. Kap 4.5.1). Eine Mutation im NES an Position 137 des NS1 von Valin zu Isoleucin konnte auch im Fall einer tödlich verlaufenen Tier-zu-Mensch Übertragung eines H7N7-Virus 2003 in den Niederlanden als einzige Mutation festgestellt werden, die das NS1-Protein des menschlichen von dem des aviären Virusisolats unterschied (Fouchier et al., 2004). Dies könnte ein weiteres Indiz für die Relevanz der Anpassung des NES für eine gesteigerte Transmissionfähigkeit des Virus darstellen.
Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die durch die Mutationen im NES und dem NoLS des NS1-Proteins der hochpathogenen Viren verursachte optimierte Verteilung des Proteins offenbar eine erhöhte Infektionseffizienz ermöglicht. Die verstärkte Akkumulation im Nukleolus und der erhöhte Export des NS1 in das Zytoplasma wirken additiv, um eine gesteigerte Virulenz des Influenzavirus zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Im Jahr 1999 kam es in Italien bei Geflügel zu einem Ausbruch hochpathogener aviärer Influenza A-Viren (HPAI-Viren) des Subtyps H7N1, der zum Verlust von 14 Millionen Tieren führte. Aus Stammbaumanalysen ging hervor, dass die HPAI-Viren aus bereits zuvor zirkulierenden Influenzaviren niedriger Pathogenität (LPAI-Viren) hervorgingen. Neben der Entwicklung einer multibasischen Spaltstelle im Hämagglutinin (HA) dieser Viren konnten durch Sequenzanalysen weitere markante Unterschiede zwischen HPAI- und LPAI-Viren detektiert werden. Das HA der HPAI-Viren wies eine zusätzliche Glykosylierung an Position 123 in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle auf. Die meisten LPAI-Isolate besitzen dort kein oder nur ein Glykan an Position 149. Im NS1-Protein, welches den viralen Faktor für die Suppression der zellulären Immunantwort darstellt, konnten Mutationen im Kernexportsignal (NES) sowie eine Deletion von sechs Aminosäuren am C-Terminus der HPAI-Viren festgestellt werden.

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurden daher rekombinante Viren des HPAI-Isolats A/ostrich/Italy/984/00 (984) generiert, die sich ausschließlich in den Glykosylierungstellen nahe der Rezeptorbindungstasche des HAs unterschieden. Das Vorhandensein eines Glykans an Position 123 stellte sich in den Experimenten als signifikante Pathogenitätsdeterminante heraus. Die zusätzliche N-Glykosylierung führte zu einer erhöhten Freisetzungsgeschwindigkeit der Viren am Ende des Replikationszyklus. Die dadurch beschleunigte systemische Virusausbreitung im aviären Wirt steigerte die Mortalität erheblich.

Des Weiteren wurden für den zweiten Teil der Arbeit rekombinante 984 NS1-Mutanten hergestellt, deren NES und/oder C-Terminus von einem LPAI-Virusisolat stammen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Viren reduziertes Wachstum auf aviären Zellen sowie eine verminderte Infektiosität für den aviären Wirt aufwiesen. Dieser Effekt konnte auf eine veränderte Lokalisation des HPAI-NS1 in den verschiedenen Stadien der Infektion zurückgeführt werden.

Zusammengenommen bewirken das zusätzliche Glykan an Position 123 des HA und die Mutationen im NS1-Protein des HPAI-Virus eine deutliche Steigerung der Pathogenität im aviären Wirt.

7. Literaturverzeichnis

1. Anwar, T., S.K. Lal, and A.U. Khan, *Matrix protein 1: A comparative in silico study on different strains of influenza A H5N1 Virus.* Bioinformation, 2006. **1**(7): p. 253-6.

2. Aragon, T., et al., *Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6259-68.

3. Area, E., et al., *3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 308-13.

4. Baigent, S.J. and J.W. McCauley, *Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission.* Bioessays, 2003. **25**(7): p. 657-71.

5. Banks, J., et al., *Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses.* Arch Virol, 2000. **145**(5): p. 1047-58.

6. Banks, J., et al., *Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy.* Arch Virol, 2001. **146**(5): p. 963-73.

7. Baum, L.G. and J.C. Paulson, *Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity.* Acta Histochem Suppl, 1990. **40**: p. 35-8.

8. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.

9. Bornholdt, Z.A. and B.V. Prasad, *X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 559-60.

10. Bosch, F.X., et al., *Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses.* Virology, 1981. **113**(2): p. 725-35.

11. Brassard, D.L., G.P. Leser, and R.A. Lamb, *Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion.* Virology, 1996. **220**(2): p. 350-60.

12. Burgui, I., et al., *PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes.* J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 12): p. 3263-74.

13. Capua, I., et al., *Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy.* Vet Rec, 2000. **147**(22): p. 640.

14. Capua, I. and F. Mutinelli, *Mortality in Muscovy ducks (Cairina moschata) and domestic geese (Anser anser var. domestica) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype.* Avian Pathology, 2001. **30**: p. 179-183.

15. Capua, I., F. Mutinelli, and M.H. Hablovarid, *Avian embryo susceptibility to Italian H7N1 avian influenza viruses belonging to different genetic lineages.* Arch Virol, 2002. **147**(8): p. 1611-21.

16. Capua, I., et al., *The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications.* Acta Trop, 2002. **83**(1): p. 7-11.

17. Capua, I., et al., *Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches farmed in Italy.* Vet Rec, 2000. **146**(12): p. 356.

18. Chen, W., et al., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.* Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.

19. Chen, Z., Y. Li, and R.M. Krug, *Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery.* Embo J, 1999. **18**(8): p. 2273-83.

20. Chien, C.Y., et al., *Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode.* Biochemistry, 2004. **43**(7): p. 1950-62.

21. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.

22. Connor, R.J., et al., *Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates.* Virology, 1994. **205**(1): p. 17-23.

23. Crecelius, D.M., C.M. Deom, and I.T. Schulze, *Biological properties of a hemagglutinin mutant of influenza virus selected by host cells.* Virology, 1984. **139**(1): p. 164-77.

24. de la Luna, S., et al., *Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs.* J Virol, 1995. **69**(4): p. 2427-33.

25. Deom, C.M., A.J. Caton, and I.T. Schulze, *Host cell-mediated selection of a mutant influenza A virus that has lost a complex oligosaccharide from the tip of the hemagglutinin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3771-5.

26. Deshpande, K.L., et al., *Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(1): p. 36-40.

27. Desselberger, U., et al., *The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity.* Gene, 1980. **8**(3): p. 315-28.

28. Duesberg, P.H., *Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus.* J Mol Biol, 1969. **42**(3): p. 485-99.

29. Dundon, W.G., et al., *Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry.* Virus Res, 2006. **119**(2): p. 171-6.

30. Ehrhardt, C., et al., *Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses.* J Virol, 2007. **81**(7): p. 3058-67.

31. Enami, K., et al., *Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein.* J Virol, 1994. **68**(3): p. 1432-7.

32. Feldmann, A., et al., *Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos.* J Virol, 2000. **74**(17): p. 8018-27.

33. Feng, J., et al., *Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2.* Virol J, 2006. **3**: p. 102.

34. Flick, R. and G. Hobom, *Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation.* J Gen Virol, 1999. **80 (Pt 10)**: p. 2565-72.

35. Fouchier, R.A., et al., *Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls.* J Virol, 2005. **79**(5): p. 2814-22.

36. Fouchier, R.A., et al., *Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1356-61.

37. Gabriel, G., et al., *The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18590-5.

38. Gallagher, P., et al., *Addition of carbohydrate side chains at novel sites on influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule.* J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2059-73.

39. Gambaryan, A.S., et al., *Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong.* Avian Dis, 2003. **47**(3 Suppl): p. 1154-60.

40. Gao, P., et al., *Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong.* J Virol, 1999. **73**(4): p. 3184-9.

41. Garcia-Sastre, A., *Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses.* Virology, 2001. **279**(2): p. 375-84.

42. Garcia-Sastre, A., et al., *Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems.* Virology, 1998. **252**(2): p. 324-30.

43. Garten, W., et al., *Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage.* Virology, 1981. **115**(2): p. 361-74.

44. Gomez-Puertas, P., et al., *Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding.* J Virol, 2000. **74**(24): p. 11538-47.

45. Goto, H. and Y. Kawaoka, *A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10224-8.

46. Goto, H., et al., *Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus.* J Virol, 2001. **75**(19): p. 9297-301.

47. Govorkova, E.A., et al., *Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004.* J Virol, 2005. **79**(4): p. 2191-8.

48. Greenspan, D., P. Palese, and M. Krystal, *Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein.* J Virol, 1988. **62**(8): p. 3020-6.

49. Guo, Z., et al., *NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(3): p. 263-9.

50. Hatada, E. and R. Fukuda, *Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro.* J Gen Virol, 1992. **73 (Pt 12)**: p. 3325-9.

51. Hatta, M., et al., *Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses.* Science, 2001. **293**(5536): p. 1840-2.

52. Helenius, A., *Unpacking the incoming influenza virus.* Cell, 1992. **69**(4): p. 577-8.

53. Herrler, G. and H.D. Klenk, *Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus.* Adv Virus Res, 1991. **40**: p. 213-34.

54. Herrler, G., et al., *Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoproteins.* Virology, 1981. **113**(2): p. 439-51.

55. Hinshaw, V.S., et al., *Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks.* Virology, 1980. **102**(2): p. 412-9.

56. Hiscox, J.A., *The nucleolus--a gateway to viral infection?* Arch Virol, 2002. **147**(6): p. 1077-89.

57. Hoffmann, E. and R.G. Webster, *Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids.* J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 12): p. 2843-7.

58. Hoyle, L., *Structure of the influenza virus; the relation between biological activity and chemical structure of virus fractions.* J Hyg (Lond), 1952. **50**(2): p. 229-45.

59. Hsu, M.T., et al., *Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 8140-4.

60. Inglis, S.C. and J.W. Almond, *An influenza virus gene encoding two different proteins.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **288**(1029): p. 375-81.

61. Ito, T., et al., *Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals.* J Vet Med Sci, 1999. **61**(8): p. 955-8.

62. Iwatsuki-Horimoto, K., et al., *Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence.* J Virol, 2004. **78**(18): p. 10149-55.

63. Jelen, F., et al., *PDZ domains - common players in the cell signaling.* Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 985-1017.

64. Johnson, N.P. and J. Mueller, *Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic.* Bull Hist Med, 2002. **76**(1): p. 105-15.

65. Kaverin, N.V., et al., *Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 10): p. 2497-505.

66. Kawaoka, Y., S. Krauss, and R.G. Webster, *Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics.* J Virol, 1989. **63**(11): p. 4603-8.

67. Klenk, H.D. and W. Garten, *Host cell proteases controlling virus pathogenicity.* Trends Microbiol, 1994. **2**(2): p. 39-43.

68. Klenk, H.D. and R. Rott, *The molecular biology of influenza virus pathogenicity.* Adv Virus Res, 1988. **34**: p. 247-81.

69. Klenk, H.D., et al., *Activation of influenza A viruses by trypsin treatment.* Virology, 1975. **68**(2): p. 426-39.

70. Kobayashi, Y., et al., *Neuropathological studies of chickens infected with highly pathogenic avian influenza viruses.* J Comp Pathol, 1996. **114**(2): p. 131-47.

71. Krug, R.M. and R. Soeiro, *Studies on the intranuclear localization of influenza virus-specific proteins.* Virology, 1975. **64**(2): p. 378-87.

72. Krug, R.M., et al., *Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein.* Virology, 2003. **309**(2): p. 181-9.

73. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

74. Lamb, R.A. and C.J. Lai, *Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains.* Virology, 1981. **112**(2): p. 746-51.

75. Lamb, R.A. and M. Takeda, *Death by influenza virus protein.* Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1286-8.

76. Lamb, R.A., S.L. Zebedee, and C.D. Richardson, *Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface.* Cell, 1985. **40**(3): p. 627-33.

77. Li, M.L., P. Rao, and R.M. Krug, *The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits.* Embo J, 2001. **20**(8): p. 2078-86.

78. Li, S., et al., *Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA.* Virology, 2006. **349**(1): p. 13-21.

79. Li, X. and P. Palese, *Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 1245-9.

80. Li, Y., Y. Yamakita, and R.M. Krug, *Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 4864-9.

81. Lipatov, A.S., et al., *Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 4): p. 1121-30.

82. Lu, Y., et al., *Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the elF-2 translation initiation factor.* Virology, 1995. **214**(1): p. 222-8.

83. Luo, G.X., et al., *The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure.* J Virol, 1991. **65**(6): p. 2861-7.

84. MacRae, S., Newton, R., Wattrang, E., Daly, J.M. *Genetic basis for pathogenicity differences between strains of equine influenza A H3N8 subtype viruses*. in *Abstract at 3rd Orthomyxovirus Research Conference*. 2005. Cambridge, UK.

85. Matrosovich, M., et al., *The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties.* J Virol, 1999. **73**(2): p. 1146-55.

86. Matrosovich, M.N., et al., *Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4620-4.

87. Matthews, D.A., *Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm.* J Virol, 2001. **75**(2): p. 1031-8.

88. Melen, K., et al., *Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes.* J Virol, 2007. **81**(11): p. 5995-6006.

89. Mibayashi, M., et al., *Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus.* J Virol, 2007. **81**(2): p. 514-24.

90. Min, J.Y. and R.M. Krug, *The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7100-5.

91. Mo, I.P., et al., *Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity.* Avian Dis, 1997. **41**(1): p. 125-36.

92. Mori, Y., et al., *Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication.* J Virol, 2005. **79**(6): p. 3448-58.

93. Muramoto, Y., T. Noda, and Y. Kawaoka, *[Selective packaging mechanism for influenza A virus].* Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006. **51**(11): p. 1596-601.

94. Nemeroff, M.E., et al., *Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs.* Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 991-1000.

95. Nemeroff, M.E., X.Y. Qian, and R.M. Krug, *The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo.* Virology, 1995. **212**(2): p. 422-8.

96. Neumann, G., et al., *Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9345-50.

97. Noah, D.L., K.Y. Twu, and R.M. Krug, *Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAS.* Virology, 2003. **307**(2): p. 386-95.

98. Obenauer, J.C., et al., *Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates.* Science, 2006. **311**(5767): p. 1576-80.

99. Ohuchi, M., et al., *Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety.* J Virol, 1997. **71**(11): p. 8377-84.

100. Okuwaki, M., et al., *Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins.* J Mol Biol, 2001. **311**(1): p. 41-55.

101. O'Neill, R.E., J. Talon, and P. Palese, *The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins.* Embo J, 1998. **17**(1): p. 288-96.

102. Parvin, J.D., et al., *Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase.* J Virol, 1989. **63**(12): p. 5142-52.

103. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.* Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.

104. Pinto, L.H., L.J. Holsinger, and R.A. Lamb, *Influenza virus M2 protein has ion channel activity.* Cell, 1992. **69**(3): p. 517-28.

105. Qian, X.Y., F. Alonso-Caplen, and R.M. Krug, *Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA.* J Virol, 1994. **68**(4): p. 2433-41.

106. Reid, A.H., et al., *Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1651-6.

107. Richardson, J.C. and R.K. Akkina, *NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells.* Arch Virol, 1991. **116**(1-4): p. 69-80.

108. Rogers, G.N. and J.C. Paulson, *Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin.* Virology, 1983. **127**(2): p. 361-73.

109. Rott, R., *The pathogenic determinant of influenza virus.* Vet Microbiol, 1992. **33**(1-4): p. 303-10.

110. Salomon, R., et al., *The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04.* J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 689-97.

111. Schaefer, M.K., and R. Day., *In situ hybridization techniques to map processing enzymes.* Methods Neurosci., 1995. **23**: p. 16-44.

112. Scheiffele, P., et al., *Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane.* J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2038-44.

113. Scholtissek, C., *Influenza virus genetics.* Adv Genet, 1979. **20**: p. 1-36.

114. Scholtissek, C., et al., *The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses.* Virology, 1985. **147**(2): p. 287-94.

115. Scholtissek, C., S. Ludwig, and W.M. Fitch, *Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages.* Arch Virol, 1993. **131**(3-4): p. 237-50.

116. Seo, S.H., E. Hoffmann, and R.G. Webster, *The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses.* Virus Res, 2004. **103**(1-2): p. 107-13.

117. Sheng, M. and C. Sala, *PDZ domains and the organization of supramolecular complexes.* Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1-29.

118. Shi, L., et al., *Influenza A virus RNA polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme.* Virology, 1995. **208**(1): p. 38-47.

119. Shinya, K., et al., *Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 547-53.

120. Silverman, R.H., *A scientific journey through the 2-5A/RNase L system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(5-6): p. 381-8.

121. Skehel, J.J., et al., *Membrane fusion by influenza hemagglutinin.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995. **60**: p. 573-80.

122. Skehel, J.J., et al., *A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(6): p. 1779-83.

123. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.

124. Snyder, M.H., et al., *The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys.* J Virol, 1987. **61**(9): p. 2857-63.

125. Solorzano, A., et al., *Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs.* J Virol, 2005. **79**(12): p. 7535-43.

126. Spackman, E., et al., *Sequence analysis of recent H7 avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States.* J Virol, 2003. **77**(24): p. 13399-402.

127. Stasakova, J., et al., *Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 1): p. 185-95.

128. Stieneke-Grober, A., et al., *Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease.* Embo J, 1992. **11**(7): p. 2407-14.

129. Subbarao, E.K., W. London, and B.R. Murphy, *A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range.* J Virol, 1993. **67**(4): p. 1761-4.

130. Sugrue, R.J. and A.J. Hay, *Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel.* Virology, 1991. **180**(2): p. 617-24.

131. Tada, Y., et al., *Phosphorylation of influenza C virus CM2 protein.* Virus Res, 1998. **58**(1-2): p. 65-72.

132. Talon, J., et al., *Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein.* J Virol, 2000. **74**(17): p. 7989-96.

133. Tashiro, M., et al., *Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity.* Virology, 1987. **157**(2): p. 421-30.

134. Taubenberger, J.K., et al., *Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus.* Science, 1997. **275**(5307): p. 1793-6.

135. Taubenberger, J.K., et al., *Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes.* Nature, 2005. **437**(7060): p. 889-93.

136. Tsuchiya, E., et al., *Role of overlapping glycosylation sequons in antigenic properties, intracellular transport and biological activities of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 12): p. 3067-74.

137. Ulmanen, I., B.A. Broni, and R.M. Krug, *Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7355-9.

138. Varghese, J.N., et al., *The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor.* Proteins, 1992. **14**(3): p. 327-32.

139. Vey, M., et al., *Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R.* Virology, 1992. **188**(1): p. 408-13.

140. Wagner, R., M. Matrosovich, and H.D. Klenk, *Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections.* Rev Med Virol, 2002. **12**(3): p. 159-66.

141. Wagner, R., et al., *Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics.* J Virol, 2000. **74**(14): p. 6316-23.

142. Wang, P., P. Palese, and R.E. O'Neill, *The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza a virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal.* J Virol, 1997. **71**(3): p. 1850-6.

143. Wang, S.H., et al., *Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 12): p. 3093-102.

144. Wang, W. and R.M. Krug, *The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses.* Virology, 1996. **223**(1): p. 41-50.

145. Wang, W. and R.M. Krug, *U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein.* Rna, 1998. **4**(1): p. 55-64.

146. Wang, W., et al., *RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids.* Rna, 1999. **5**(2): p. 195-205.

147. Wang, X., et al., *Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon.* J Virol, 2000. **74**(24): p. 11566-73.

148. Webby, R.J. and R.G. Webster, *Emergence of influenza A viruses.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1416): p. 1817-28.

149. Webster, R.G., W.G. Laver, and B. Tumova, *Studies on the origin of pandemic influenza viruses V. Persistence of Asian influenza virus hemagglutinin (H2) antigen in nature?* Virology, 1975. **67**(2): p. 534-43.

150. Westaway, E.G., et al., *Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus.* Virology, 1997. **234**(1): p. 31-41.

151. Whittaker, G., M. Bui, and A. Helenius, *Nuclear trafficking of influenza virus ribonuleoproteins in heterokaryons.* J Virol, 1996. **70**(5): p. 2743-56.

152. Wiley, D.C. and J.J. Skehel, *The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus.* Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 365-94.

153. Wood, G.W., et al., *Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes.* Arch Virol, 1993. **130**(1-2): p. 209-17.

154. Yasuda, J., et al., *Regulatory effects of matrix protein variations on influenza virus growth.* Arch Virol, 1993. **133**(3-4): p. 283-94.

155. Yuen, K.Y., et al., *Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus.* Lancet, 1998. **351**(9101): p. 467-71.

156. Zell, R., et al., *Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 536-46.

157. Zhirnov, O.P., M.R. Ikizler, and P.F. Wright, *Cleavage of influenza a virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases.* J Virol, 2002. **76**(17): p. 8682-9.

158. Zhirnov, O.P. and H.D. Klenk, *Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling.* Apoptosis, 2007. **12**(8): p. 1419-32.

159. Zhou, N.N., et al., *Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong.* J Virol, 1999. **73**(4): p. 3366-74.

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
cRNA	complementary RNA
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dH_2O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco’s modified Eagle’s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	double stranded
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
eIF-2α	eukaryotic translation initiation factor 2α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein
IFN	Interferon
IRF	interferon regulatory factors
k	Kilo
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
m	milli
M	molar
M1	Matrixprotein
Mda-5	melanoma differentiation-associated gene 5
MEM	minimal essential medium
min	Minute

mol	Mol
mRNA	messenger RNA
µ	mikro
n	nano
NA	Neuraminidase
NC	Nitrocellulose
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localisation signal
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2/NEP	Nichtstrukturprotein 2/ nukleäres Exportprotein
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PA	Polymeraseprotein, azidisch
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB1	Polymeraseprotein basisch 1
PB2	Polymeraseprotein basisch 2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming units
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	potentia hydrogenii
PKR	protein kinase R
Pol	Polymerase
poly(A)-	Polyadenylierungs-
Rig-I	retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
ss	single stranded
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	*N,N,N,N´´*-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	transformation and storage solution

U	Unit
V	Volt
vRNA	virale RNA
WHO	world health organisation
wt	Wildtyp

Aminosäuren:	A	(Ala)	=	Alanin
	C	(Cys)	=	Cystein
	D	(Asp)	=	Asparaginsäure
	E	(Glu)	=	Glutaminsäure
	F	(Phe)	=	Phenylalanin
	G	(Gly)	=	Glycin
	H	(His)	=	Histidin
	I	(Ile)	=	Isoleucin
	K	(Lys)	=	Lysin
	L	(Leu)	=	Leucin
	M	(Met)	=	Methionin
	N	(Asn)	=	Asparagin
	P	(Pro)	=	Prolin
	Q	(Gln)	=	Glutamin
	R	(Arg)	=	Arginin
	S	(Ser)	=	Serin
	T	(Thr)	=	Treonin
	V	(Val)	=	Valin
	W	(Trp)	=	Tryptophan
	Y	(Tyr)	=	Tyrosin

9. Lebenslauf

Zur Person

Björn Keiner
Diplom-Biologe
geboren am 29.02.1976 in München

Berufspraxis

2004-2008	Doktorarbeit am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Betreuer: Prof. Dr. W.Buckel, Prof. Dr. H.-D. Klenk Thema: „Mutationen im Hämagglutinin und dem NS1-Protein steigern die Virulenz hochpathogener aviärer Influenzaviren“

Schule und Studium

2003-2004	Diplomarbeit am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Betreuer: Prof. Dr. H.-D. Klenk, Dr. Ralf Wagner Thema: „Die Rolle des Hämagglutinins als Pathogenitätsdterminante aviärer Influenzaviren“
2003	Diplom-Prüfung in den Fächern: Virologie, Mikrobiologie und Zellbiologie
1996-2003	Studium des Studienganges Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1996-2002	Nebenjob in der Buchaltung der Firma Hedrich vacuum systems, Ehringshausen-Katzenfurt
1995-1996	Zivildienst Deutsches Rotes Kreuz Wetzlar
1992-1995	Goethe-Gymnasium Wetzlar Allgemeine Hochschulreife
1986-1992	Gesamtschule Ehringshausen
1982-1986	Grundschule Asslar/Werdorf

Wissenschaftliche Aktivitäten und Fortbildungen

2007	Fortbildung zum Projektleiter und Beauftragten für Biologische Sicherheit
2007	Reviewer für das Journal „Archives of Virology“
2005	Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV)

Wissenschaftliche Förderungen

2006-2007	Forschungsschwerpunkt 1130 der DFG
	Infektionen des Endothels
2004-2006	Forschungsprojekt der Europäischen Union (EU) Aviflu
	Pathogenesis and improved diagnosis and control of avian influenza infections

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Gabriel G., Abram M, Keiner B., Wagner R., Klenk H.-D., Stech J.

Differential Polymerase Activity in Avian and Mammalian Cells Determines Host Range of Influenza Virus

Journal of Virology 2007

Vorträge

Keiner B., Wagner R., Herwig A., Klenk H.-D.

Hemagglutinin Glycosylation Promotes Spread of Infection of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H7N1)

Options for the Control of Influenza VI, Toronto, Kanada 2007

Gabriel G., Abram M., Keiner B., Wagner R., Klenk H.-D., Stech J.

Differential Polymerase Activity in Avian and Mammalian Cells Determines Host Range of Influenza Virus

Options for the Control of Influ enza VI, Toronto, Kanada 2007

Mänz B., Keiner B., Klenk H.-D.

High Pathogenicity of an Avian Influenza Virus (H7N1) is regulated by the Shuttling Ability of NS1 between Nucleolus and Cytoplasm

Third European Congress of Virology, Nürnberg 2007

Keiner B., Gabriel G., Herwig A., Klenk H.-D.

Endotheliotropism of the avian influenza virus SC35 and its mouse adapted variant SC35M

Symposium des Forschungsschwerpunkts 1130 der DFG, Oberbärenburg, 2007

Keiner B., Wagner, R., Herwig A., Klenk H.-D.

Enhanced Virus Growth Triggered by Head Glycans of Avian Influenza A Virus Hemagglutinin

Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, München 2006

Stech J., Keiner B., Gabriel G., Jung S., Klenk H.-D.

Infektionen des Endothels

Symposium des Forschungsschwerpunkts 1130 der DFG, Hirschegg, 2006

Keiner B., Wagner, R., Herwig A., Klenk H.-D.

Pathogenesis and improved diagnosis and control of avian influenza infections

EU Aviflu 3rd Year Meeting, St. Brieuc, Frankreich, 2005

Keiner B., Wagner, R., Herwig A., Klenk H.-D.

Pathogenesis and improved diagnosis and control of avian influenza infections

EU Aviflu 2nd Year Meeting, Padova, Italien, 2004

Poster

Keiner B., Wagner R., Herwig A., Klenk H.-D.

Hemagglutinin Glycosylation Promotes Spread of Infection of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H7N1)

Third European Congress of Virology, Nürnberg 2007

Keiner B., Wagner R., Herwig A., Klenk H.-D.

Head Glycans of Influenza A Virus HA influence Cell Tropism and Pathogenicity in Chicken Embryos

Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Hannover 2005

Eidesstattliche Erklärung

ich versichere, daß ich meine Dissertation

Mutationen im Hämagglutinin und dem NS1-Protein steigern die Virulenz hochpathogener aviärer Influenzaviren

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.
Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

_______________________________ _______________________________
(Ort/Datum) (Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und die hervorragende Betreuung, die mir bei der Anfertigung der Arbeit zu Teil wurde. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken, bestehend aus Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach, Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel, der freundlicherweise die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie übernommen hat.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinem ehemaligen Betreuer Ralf Wagner, der seine Begeisterung für die Influenza-Forschung an mich weitergegeben hat und mich durch seine Lauffähigkeiten im Sport auch nach seinem Weggang sehr beeindruckt hat. Ebenfalls besonderer Dank gilt den beiden leider „ehemaligen" guten Seelen der Arbeitsgruppe, Astrid und Katharina. Die beiden standen mir immer mit Rat und Tat, aber auch mit kreativen Ideen zur Verfügung und waren sich nie für einen Kaffee zu schade.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei all „meinen" Diplomanden/innen, „meiner" Bachelor-Studentin und den Praktikanten und Praktikantinnen in unserem Labor. Hierbei sind besonders Annika, Ben, Maren, Franzi und Christin hervorzuheben, mit denen es im Laboralltag nie langweilig wurde.

Weiterer großer Dank geht an all die vielen Kollegen und Kolleginnen der AG Klenk und des gesamten Instituts für Virologie, mit denen man hervorragend diskutieren aber auch durchaus einmal eine kleine Feier starten konnte.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner gesamten Familie und meiner Traumfrau Andrea bedanken, die mich durch meine Doktorarbeit begleitet und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.